

**Untersuchungen zum Metabolismus
von Chlortoluolen:
Konstruktion Chlortoluol und
Chlorbenzylalkohol verwertender
Mikroorganismen**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Anja Lehning

aus Unna

1. Referentin oder Referent:

2. Referentin oder Referent:

eingereicht am:

mündliche Prüfung (Disputation) am:

Professor Dr. K. N. Timmis

Professor Dr. J. Wehland

04.05.98

03.07.98

Vorabveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin oder den Mentor / die Betreuerin oder den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Lehning, A., U. Fock, R.-M. Wittich, K. N. Timmis & D. H. Pieper.

Metabolism of Chlorotoluenes by *Burkholderia* sp. Strain PS12 and Toluene Dioxygenase of *Pseudomonas putida* F1: Evidence for Monooxygenation by Toluene and Chlorobenzene Dioxygenases. Appl. Environ. Microbiol. **63**:1974-1979 (1997).

Tagungsbeiträge

Lehning, A., Happe, B., Timmis, K. N. & D. H. Pieper.

Metabolism of Chlorotoluenes by enriched and constructed Bacteria. (Poster 81).
UIB-GBF-CSIC-TUB Symposium, Biodegradation of Organic Pollutants,
Palma de Mallorca (1996).

Lehning, A., Happe, B., Timmis, K. N. & D. H. Pieper.

Complementation of Bacteria for Chlorotoluene Degradation. (Poster PU068).
VAAM Frühjahrstagung 1997, Hamburg (1997).

Lehning, A., Timmis, K. N. & D. H. Pieper.

Engineering of Chlorotoluene degrading Microorganisms. (Poster 208).
Pseudomonas 97, VI International Congress on *Pseudomonas*: Molecular Biology and
Biotechnology, Madrid (1997).

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	4
1.1 Schadstoffe in der Natur.....	4
1.2 Toluol	5
1.3 Xylol.....	7
1.4 Benzol.....	8
1.5 Brenzkatechin.....	8
1.6 Chlorierte Benzole.....	10
1.7 Chlorierte Brenzkatechine.....	11
1.8 Substratmischungen.....	15
1.9 Chlormethylaromaten	17
1.10 Experimentelle Evolution katabolischer Abbauwege	18
1.11 Chlortoluole.....	20
1.12 Segmente zum Abbau von Chlortoluolen.....	22
1.13 Konstruktionsmethoden	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Geräte	27
2.2 Chemikalien.....	28
2.3 Organismen	29
2.4 Nährmedien, Puffer und Lösungen	30
2.4.1 Vollmedien.....	30
2.4.2 Mineralsalzmedium.....	31
2.4.3 Kohlenstoffquellen.....	32
2.4.4 Selektionsmarker und sonstige Medienzusätze.....	32
2.4.5 Sonstige Puffer und Lösungen	33
2.5 Stammhaltung, Zellanzucht und Zellernte	34
2.5.1 Stammhaltung	34
2.5.2 Zellanzucht.....	34
2.5.3 Zellernte	34
2.6 Kontinuierliche Kultivierung im Fermenter.....	35
2.7 Wachstumsmessung	35
2.8 Messung der Sauerstoffaufnahme.....	36
2.9 Herstellung von Protein-Rohextrakten	36
2.10 Bestimmung von Proteingehalten.....	37
2.11 Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	37
2.11.1 Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase	37
2.11.2 Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase	38
2.11.3 <i>cis</i> -3,5-Cyclohexadien-1,2-diol Dehydrogenase	38
2.11.4 Dienlacton Hydrolase.....	39
2.11.5 2-Chlorbenzoat-Dioxygenase	39
2.11.6 Benzylalkohol-Dehydrogenase	40
2.11.7 Benzaldehyd-Dehydrogenase.....	40
2.12 Durchführung von Substratumsätzen	41
2.13 Durchführung von Induktionsversuchen	41
2.14 Chromatographische und spektroskopische Methoden.....	41
2.14.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	42
2.14.1.1 Analytische HPLC.....	42
2.15 Agarosegelelektrophorese	42
2.16 DNA-Präparation.....	43
2.16.1 Maxipräparation von Plasmid-DNA	43
2.16.2 Präparation von Plasmid-DNA mit Hilfe von Qiagen-Säulen	43
2.16.3 Präparation von Plasmid-DNA mit Qiagen-Spinprep.....	44

2.16.4 Schnellisolierung von Plasmid-DNA.....	44
2.16.5 Präparation genomischer DNA	44
2.16.6 DNA-Phenolreinigung	44
2.16.7 Aufreinigung von DNA durch Tropfendialyse	45
2.17 Extraktion von DNA-Banden aus einem Agarosegel.....	45
2.18 Konzentrationsbestimmung von DNA	45
2.19 Southern-Blot	46
2.20 Nicht-Radioaktive DNA-Hybridisierung	46
2.21 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	46
2.22 Enzymatische Manipulationen von DNA.....	47
2.22.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	47
2.22.2 Abspaltung endständiger Phosphatgruppen von DNA	47
2.22.3 Ligation	48
2.23 Einschleusen von DNA in Empfängerorganismen.....	48
2.23.1 Transformation.....	48
2.23.2 Konjugation (biparental und triparental)	49
2.23.3 Minitransposonmutagenese.....	49
3 Experimente und Ergebnisse	50
3.1 Ausgangsstämme	50
3.1.1 Substratspektren.....	50
3.1.2 Sauerstoffaufnahme.....	52
3.1.3 Umsatzversuche	54
3.1.4 Enzymtests	60
3.2 Konstruktionsplanung	63
3.2.1 Rezipientenstämme	64
3.2.2 Benötigte Sequenzen.....	65
3.2.3 Vorhandene Genkassetten.....	65
3.2.3.1 Obere Toluol Abbaugene des Plasmides pWW0	66
3.2.3.2 Chlorbrenzkatechin Abbaugene.....	67
3.2.3.3 2-Halobenzoat Dioxygenase Gene.....	68
3.2.4 Konstruktion der 2-Halobenzoat Dioxygenase Kassette	69
3.2.5 Konjugationsexperimente	70
3.3 Derivate des Stammes <i>Pseudomonas putida</i> F1.....	72
3.3.1 <i>Pseudomonas putida</i> F1*	72
3.3.2 <i>Pseudomonas putida</i> F1Δ	75
3.3.3 <i>Pseudomonas putida</i> F1ΔCC	81
3.3.4 <i>Pseudomonas putida</i> F1AL.....	87
3.3.5 Stabilität	98
3.3.6 2-Chlorbenzoat Dioxygenase-Kassette mit Tellurit-Resistenz.....	100
3.3.7 Fermentation	100
3.3.7.1 Fermentation Nr. 1.....	100
3.3.7.2 Fermentation Nr. 2.....	101
3.4 Derivate des Stammes <i>Burkholderia</i> sp. PS12.....	102
3.4.1 <i>Burkholderia</i> sp. PS12*	102
3.4.2 <i>Burkholderia</i> sp. PS12* + pKT231cbd.....	104
3.4.3 <i>Burkholderia</i> sp. PS12Δ.....	107
3.4.4 <i>Burkholderia</i> sp. PS12Δ + pKT231cbd	109
3.4.5 <i>Burkholderia</i> sp. PS12AL.....	111
3.4.6 Chloridfreisetzung.....	113
4 Diskussion.....	114
4.1 Ausgangsstamm <i>Pseudomonas putida</i> F1	114
4.2 Ausgangsstamm <i>Burkholderia</i> sp. PS12	119
4.3 Konstrukte <i>Pseudomonas putida</i> F1AL und <i>Burkholderia</i> sp. PS12AL	121

4.3.1 (Chlor-)benzylalkohole	121
4.3.2 3-Chlortoluol	124
4.3.3 Toluol	127
4.3.4 Xylol	129
4.3.5 4-Chlortoluol	130
4.3.6 Chlorbenzol	132
4.3.7 2-Chlortoluol	136
4.4 Ausblick	139
5 Zusammenfassung	143
6 Abkürzungen	145
7 Literatur	147

1 Einleitung

1.1 Schadstoffe in der Natur

Mikroorganismen sind am Abbau der großen Vielfalt biogener Verbindungen maßgeblich beteiligt. Durch hohe genetische Mobilität, Anpassungsfähigkeit an diverse Umweltbedingungen sowie Selektionsbedingungen über Millionen von Jahren konnten sie fast eine Omnipotenz beim Abbau auch noch so kompliziert gebauter Naturstoffe entwickeln (Knackmuss, 1979).

Bevor industrielle Aktivitäten im größeren Maßstab entstanden, hielten sich daher Biosynthese und biologische Mineralisation der Biomasse und Produkte aller Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen im Gleichgewicht. Heutzutage wird unsere Umwelt jedoch mit vielen organischen Verbindungen der industriellen Produktion konfrontiert, die sich nicht vollständig in die globalen Kreisläufe von Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel einfügen lassen und daher in der Natur persistieren (Leisinger, 1983).

Die Akkumulation organischer Verbindungen in der Natur kann durch deren chemische und physikalische Eigenschaften bedingt sein. Solche Eigenschaften sind vor allem die Molekülgröße, die Länge von Seitenketten mit Quervernetzung zu Polymeren, die Wasserlöslichkeit und Flüchtigkeit von Verbindungen, sowie die Substitution mit unphysiologischen Gruppen (Alexander und Lustigmann, 1966; Pitter, 1976; Knackmuss, 1980; Leisinger, 1983; Knackmuss, 1983a; Knackmuss, 1983b), wie Halogen-, Nitro- und Sulfonsäuresubstituenten. Letztere verleihen den Substanzen einen xenobiotischen Charakter. Mikroorganismen wurden diesen Verbindungen in der Natur nur in sehr geringen Mengen und erst seit kurzer Zeit in großen Mengen ausgesetzt, sie sind daher in der Regel, was die Mineralisierung und Nutzung betrifft, nur gering an sie angepaßt, wobei man aber von einem bestimmten vorhandenen Potential zur Mineralisierung ausgehen kann.

In den letzten Jahrzehnten sind aromatische Verbindungen sowie Haloaromaten, welche als landwirtschaftliche oder industrielle Chemikalien, z.B. als Lösungsmittel, Geruchsstoffe, Feuerschutzmittel oder Pestizide verwendet werden, zu einem wesentlichen Teil unserer Wirtschaft geworden. Sie gelangen vorsätzlich oder unbeabsichtigt in großen Mengen in die Umwelt, wodurch sie zu Verschmutzungen mit toxischen Nebeneffekten auf unsere Biosphäre sowie zu schwerwiegenden Zerstörungen unserer Lebensbedingungen führen (Pearson, 1982; Lee et al., 1995). Viele dieser Substanzen sind zudem mutagen oder karzinogen.

Eine Gruppe aromatischer Substanzen, welche normalerweise zusammen in Benzin, Diesel, Flugzeugtreibstoff und Erdöl auftreten, sind die sogenannten BTX-Aromaten (Benzol und dessen methylierte Homologe Toluol und die isomeren Xylole (Müller, 1992; Lee et al., 1995)). Diese Substanzen sind an der Verschmutzung von Trinkwasserressourcen maßgeblich beteiligt (Lee et al., 1995). Von der EPA (US Environmental Protection Agency) sind die BTX als bedeutende umweltverschmutzende und für den Menschen höchst toxische Substanzen in die Liste der vorrangigen Umweltverschmutzer eingestuft worden (Lee et al., 1994). Besonders Benzol, welches als

Karzinogen (Gruppe A) klassifiziert wurde, ist als Emission der Industrie oder des Straßenverkehrs in der Atmosphäre, und auch im Grundwasser aufgrund undichter Bodentanks oder Abfallhalden zu finden (Hughes et al., 1994).

Ebenso gelten chlorierte Benzole, welche als Lösungsmittel, Entfetter, Duftstoffe und als Intermediate zur Produktion verschiedener Pestizide und Farbstoffe genutzt werden, als umweltverschmutzende Substanzen (Chaudhry und Chapalmadugu, 1991). Polychlorierte Benzole können ebenfalls zunehmend in Boden, Luft, Wasser und auch in lebenden Organismen aufgespürt werden (Pearson, 1982).

Chlortoluole werden in der Bundesrepublik kontinuierlich durch Chlorierung von flüssigem Toluol hergestellt. Sie werden verwendet für die Herstellung von Farbstoffen, optischen Aufhellern, Pflanzenschutzmitteln und für pharmazeutische Präparate. Die Produktion in der Bundesrepublik lag 1988/89 bei 53.000t, davon fielen 5.000t auf 2-Chlortoluol, 9.000t auf 4-Chlortoluol und 39.000t auf ein Gemisch aus 2- und 4-Chlortoluol. 3-Chlortoluol machte nur ca. 0,3% der Chlortoluol Produktion in Deutschland 1988/89 aus. Die Emission in die Luft beträgt ca. 370kg/a und in Abwässern findet man ca. 1000kg/a (Drotleff et al.). Die Toxizität dieser Stoffgruppe äußert sich durch Reizungen der Haut und Atemsysteme. Sie verursachen Kopfschmerz, Übelkeit, Erbrechen, aber auch Bewußtlosigkeit, Atemlähmung und Krämpfe (Drotleff et al.).

Der mikrobielle Abbau von Schadstoffen kann als ein signifikanter Remediationsmechanismus angesehen werden (Verheul et al., 1988; Chiang et al., 1989). Es wird berichtet, daß die einzelnen Komponenten, welche ein Gemisch von BTX ausmachen, leicht durch Boden- und Wassermikroorganismen abgebaut werden können.

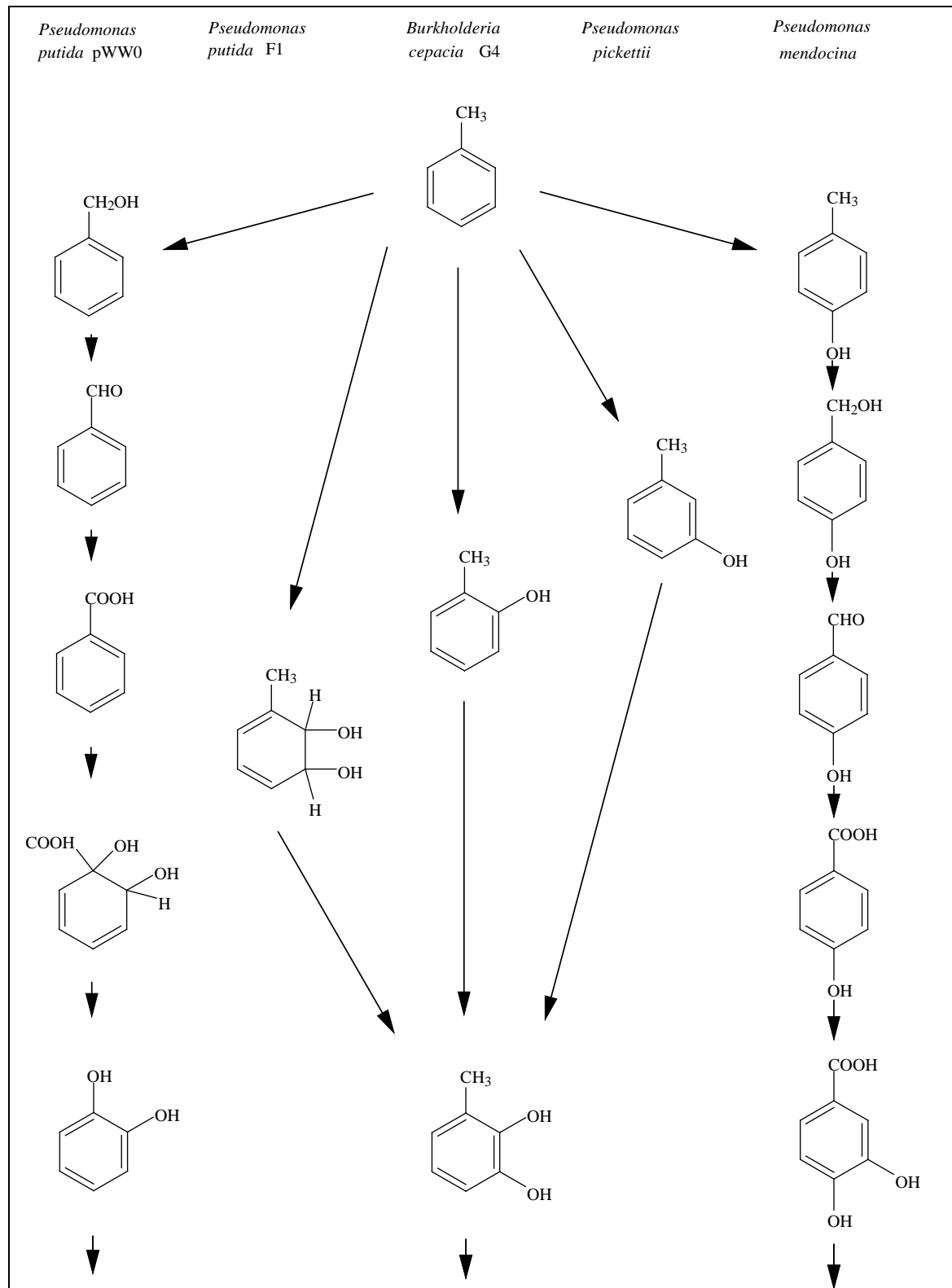
1.2 Toluol

Für den Abbau von Toluol wurden bisher fünf verschiedene bakterielle Abbauege beschrieben (siehe Abbildung 1).

Ein Weg beinhaltet die Oxidation von Toluol durch eine Xylol Oxygenase (XylMA) zu Benzylalkohol, welcher katalysiert durch eine Benzylalkohol Dehydrogenase (XylB) zum Benzaldehyd umgeformt wird. Dieser Benzaldehyd unterliegt einer weiteren Dehydrogenierung durch eine Benzaldehyd Dehydrogenase (XylC) wodurch Benzoat entsteht, welche weiterführend durch eine Toluat Dioxygenase (XylXYZ) und eine 1,2-Dihydroxycyclo-3,5-hexadiencarboxylat Dehydrogenase (XylL) zu Brenzkatechin metabolisiert wird. Dieses unterliegt einer extradiolischen Ringspaltung (*meta*-Spaltung) durch die Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase (XylE). Anschließend folgen weitere Enzymschritte, welche den gebildeten Semialdehyd unter Produktion von Tricarbonsäure-Zyklus Intermediaten weiter metabolisieren. Die für Enzyme dieses Abbauweges kodierenden Gene sind auf dem katabolischen Plasmid TOL (pWW0) lokalisiert und in zwei Operons organisiert, dem oberen

Operon (CMABN) und dem *meta*-Operon (XYZLTEGFJQKIH) (Worsey und Williams, 1975; Harayama et al., 1989; Harayama, 1994).

Abbildung 1: Verschiedene Mechanismen des Abbaus von Toluol durch Bakterien



Alle anderen Abbauewege für Toluol initiieren die Toluol Oxidation durch eine Hydroxylierung von Kohlenstoff im aromatischen Ring mit Hilfe einer Mono- oder einer Dioxygenase.

Das hiervon bestuntersuchtete Abbausystem ist das des Stammes *Pseudomonas putida* F1 (*tod*-Abbaueweg). Die Aktivierung des aromatischen Ringsystems erfolgt durch ein Drei-Komponenten Enzymsystem, die Toluol 2,3-Dioxygenase, die zwei Hydroxygruppen in das Molekül unter Bildung eines *cis*-Toluol-2,3-dihydrodiols integriert (Gibson et al., 1974). Nach Dehydrogenierung zum 3-Methylbrenzkatechin erfolgt *meta*-Spaltung durch die Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase zum 2-Hydroxy-6-oxo-2,4-heptadienoat und anschließende Metabolisierung zu 2-Hydroxypenta-2,4-dienoat und Acetat (Zylstra et al., 1988).

Toluol Monooxygenasen, welche den aromatischen Kern an allen drei möglichen Stellen unter Bildung von phenolischen Zwischenprodukten *ortho*-, *meta*- oder *para*-Cresol hydroxylieren, wurden beschrieben, diese beinhalten die Toluol 2-Monooxygenase von *Burkholderia cepacia* G4 (Shields et al., 1989), die Toluol 3-Monooxygenase von *Pseudomonas pickettii* PK01 (Kaphammer et al., 1990) und die Toluol 4-Monooxygenase von *Pseudomonas mendocina* KR1 (Richardson und Gibson, 1984). Der weitere Abbau im Fall von *o*- und *m*-Cresol erfolgt über das zentrale Intermediat 3-Methylbrenzkatechin, welches extradiol gespalten wird. Newman und Wackett zeigten, daß die oben genannte Toluol 2-Monooxygenase beide sukzessive Monooxygenierungen am aromatischen Ring unter Bildung von *o*-Cresol bzw. 3-Methylbrenzkatechin katalysiert (Newman und Wackett, 1995). Demhingegen katalysiert die Toluol 3-Monooxygenase nur eine Monooxygenierung zu *m*-Cresol (Olsen et al., 1994), welches durch eine Phenol Hydroxylase zu 3-Methylbrenzkatechin umgesetzt wird. Entsprechend katalysiert auch die Toluol 4-Monooxygenase nur eine Monooxygenierung zu *p*-Cresol (Whited und Gibson, 1991a und b). Dieses wird durch den Stamm *Pseudomonas mendocina* KR1 durch eine *p*-Cresol Methylhydroxylase an der Methylgruppe oxidiert und der gebildete *p*-Hydroxybenzylalkohol zu *p*-Hydroxybenzaldehyd dehydrogeniert, welcher im weiteren durch die *p*-Hydroxybenzaldehyd Dehydrogenase und *p*-Hydroxybenzoat Hydroxylase zu Protokatechuat als zentralem Zwischenprodukt oxidiert wird (Whited und Gibson, 1991a und b).

1.3 Xylol

Die bakterielle Oxidation von Xylenen kann wie beim Toluol einerseits durch Oxidation einer oder beider Methylgruppen initiiert werden oder durch den direkten oxidativen Angriff auf den aromatischen Ring (Davis et al., 1968; Abbott und Gledhill, 1971; Davey und Gibson, 1974; Gibson et al., 1974; Bertoni et al., 1996). Eine Mineralisierung von *m*- und *p*-Xylol wurde jedoch bisher nur nach initialer Oxidation einer Methylgruppe nachgewiesen (Worsey und Williams, 1975). Im Gegensatz dazu erfolgt der Abbau von *o*-Xylol wie von di Lecce et al. beschrieben durch zwei sukzessive Monooxygenase Reaktionen am aromatischen Ring unter Bildung der Intermediate 2,3-Dimethylphenol und 3,4-Dimethylphenol zu den entsprechenden Brenzkatechinen (di Lecce et al., 1997).

1.4 Benzol

Mehrere Jahre ging man davon aus, daß Benzol über eine Oxidation zu Phenol und weitere Oxidation zu Brenzkatechin abgebaut würde. Nachfolgende Analysen an Benzol verwertenden Stämmen schlossen jedoch Phenol als Intermediat aus (Gibson et al., 1968; Gibson et al., 1970a; Högn und Jaenicke, 1972; Axell und Geary, 1975). Nahezu sämtliche untersuchten Mikroorganismen initiieren den Benzol-Abbau durch eine Dioxygenierung zu *cis*-Benzol-1,2-dihydrodiol (Müller und Lings, 1983). Das Dihydrodiol wird umgehend durch eine *cis*-Benzol-1,2-dihydrodiol Dehydrogenase zum Brenzkatechin dehydrogeniert, welches im Folgenden einem Katabolismus zu Intermediaten des Tricarbonsäure-Zyklus unterliegt (Mason, 1994). Daß ein Benzol Abbau jedoch auch durch zwei sukzessive Monooxygenierungen erfolgen kann, zeigten Olsen et al.. Die Toluol 3-Monooxygenase des Stammes *Pseudomonas pickettii* PKO1 hydroxyliert neben Toluol und den drei Isomeren des Xylols auch Benzol am aromatischen Ring unter Bildung von Phenol. Eine Phenol Hydroxylase transformiert das Phenol zu Brenzkatechin, welches durch die Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase und Folgeenzyme metabolisiert wird (Olsen et al., 1994).

1.5 Brenzkatechin

Das während des Benzol Abbaus gebildete Brenzkatechin kann durch zwei verschiedene Mechanismen gespalten werden, einmal durch eine Spaltung zwischen den Hydroxygruppen, eine *ortho*-Spaltung (3-Oxadipat-Abbauweg) unter Bildung von *cis,cis*-Muconsäure (wie bei *Pseudomonas putida* ML2 (Mason, 1994)), und alternativ durch eine Spaltung neben den Hydroxygruppen, eine *meta*-Spaltung unter Produktion von 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd (siehe Abbildung 2). Beide Spaltprodukte können durch entsprechende Abbauewege (3-Oxadipat-Weg bzw. *meta*-spaltender Abbaueweg) in den Tricarbonsäure-Zyklus eingeschleust werden.

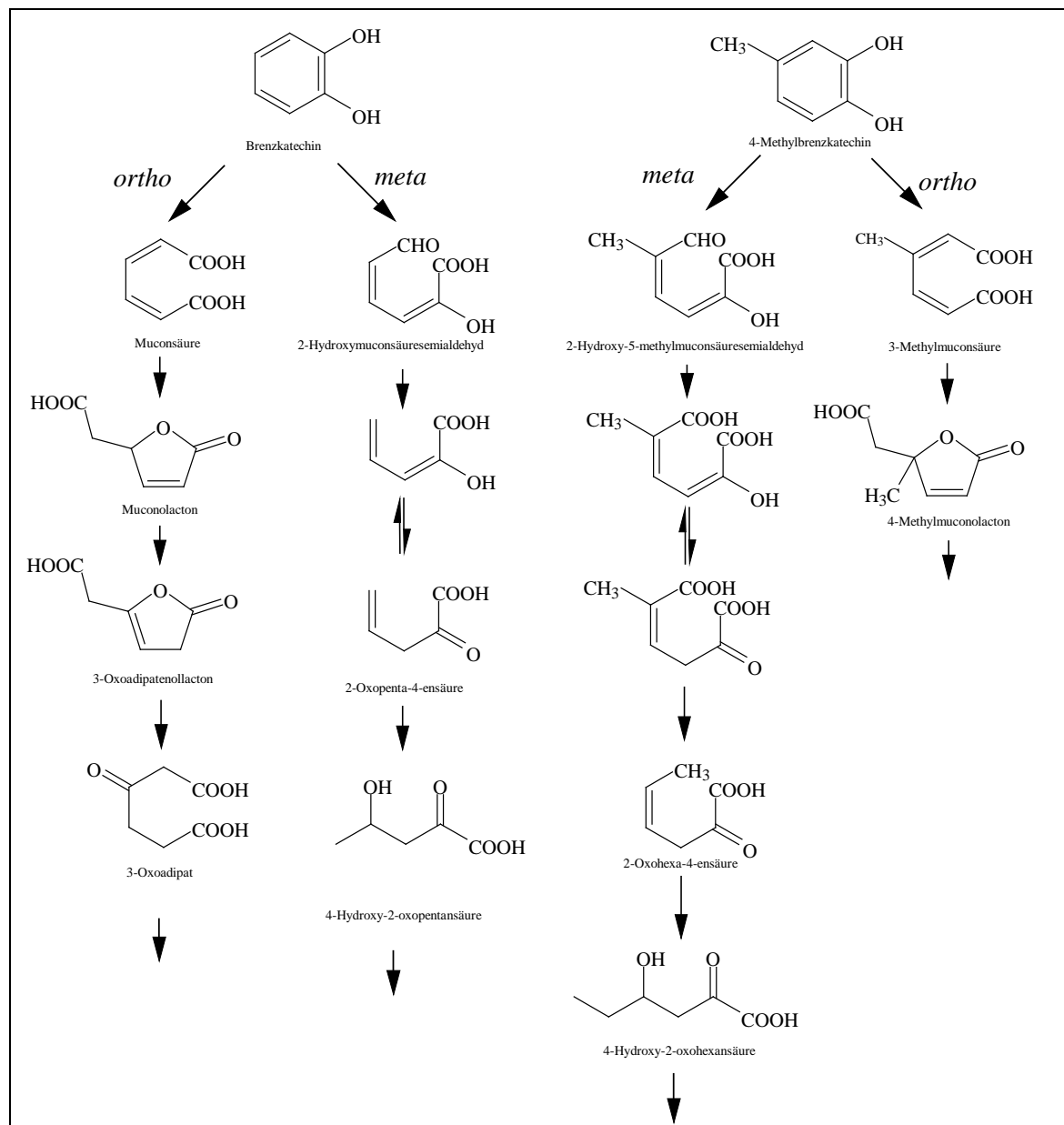
Entsprechend wurden sowohl Mikroorganismen beschrieben, die Benzol über Brenzkatechin und *ortho*-Spaltung mineralisieren (Winstanley et al., 1987; Mason, 1994), als auch solche, bei denen eine Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase in den Abbau involviert ist (Zylstra et al., 1988).

Während Brenzkatechin sowohl nach *ortho*- als auch nach *meta*-Spaltung mineralisiert werden kann, erfolgt der Abbau methylsubstituierter Brenzkatechine in der Regel über den *meta*-spaltenden Abbaueweg (siehe Abbildung 2). Ein Einschleusen methylsubstituierter Brenzkatechine in den 3-Oxadipat-Weg führt in der Regel zur Akkumulation methylsubstituierter Muconolactone als Endmetabolite (dead-end Produkte) (Catelani et al., 1971; Knackmuss et al., 1976).

Jedoch konnten in den letzten Jahren auch Mikroorganismen isoliert werden, die methylsubstituierte Brenzkatechine nach *ortho*-Spaltung zu mineralisieren vermögen (Pieper et al., 1985; Bruce und Cain, 1988). Im Falle des Metabolismus von 4-Methylbrenzkatechin wurde eine Methylmuconolacton

Methylisomerase als Schlüsselenzym identifiziert, die das bei Pseudomonaden auftretende dead-end Produkt 4-Methylmuconolacton, welches nicht durch Muconolacton Isomerasen des 3-Oxadipat-Weges umgesetzt werden kann, transformiert (Bruce et al., 1989; Pieper et al., 1990).

Abbildung 2: Brenzkatechin und 4-Methylbrenzkatechin Abbau durch *meta*- und *ortho*-Spaltung

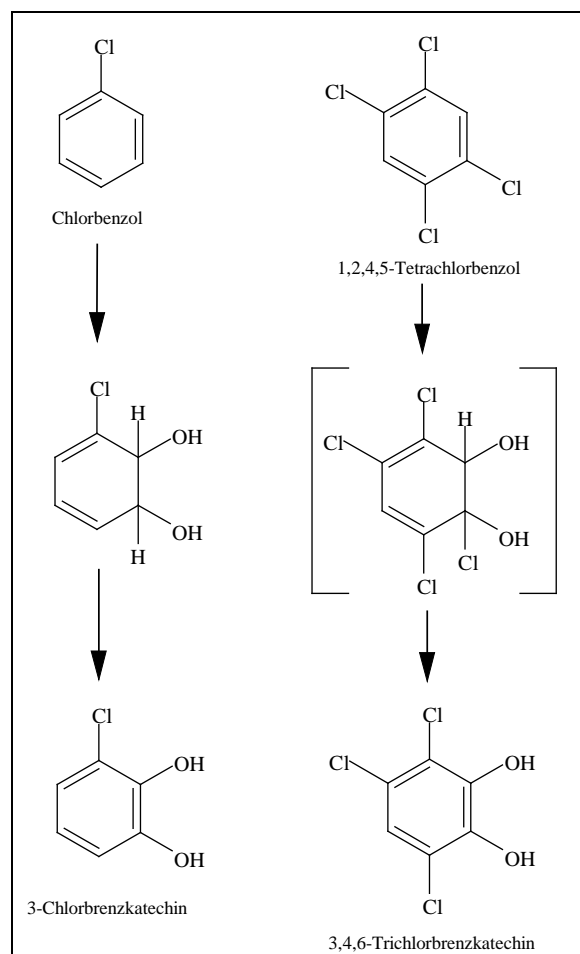


1.6 Chlorierte Benzole

Der mikrobielle Abbau von einfach und niedrig chlorierten Benzolen unter aeroben Bedingungen wurde inzwischen mehrfach beschrieben (Reineke und Knackmuss, 1984; de Bont et al., 1986; Spain und Nishino, 1987; van der Meer et al., 1987; Haigler et al., 1988; Sander et al., 1991).

Erstmalig beschrieb Reineke 1984 den Abbau von Chlorbenzol (Reineke und Knackmuss, 1984). Der oxidative Angriff in dem Stamm WR1306 erfolgt, analog dem Umsatz von Toluol durch die Toluol 2,3-Dioxygenase, durch eine Dioxygenase und führt zur Bildung von 3-Chlor-*cis*-1,2-dihydroxycyclohexa-3,5-dien (Chlorbenzol-2,3-Dihydrodiol) als Intermediat. Eine Dehydrogenase katalysiert die Rearomatisierung zu 3-Chlorbrenzkatechin. Der Benzol 1,2-Dioxygenase des Stammes dienen Benzol, Chlorbenzol und Brombenzol, aber nicht Fluorbenzol und auch nicht Dichlorbenzol als Substrate.

Abbildung 3: Abbau von Chlorbenzol und Tetrachlorbenzol zu den korrespondierenden Brenzkatechinen



Analog dazu wurden in den folgenden Jahren sowohl 1,2-, 1,3- als auch 1,4-Dichlorbenzol verwertende Mikroorganismen beschrieben, welche sämtlich den Abbau durch Dioxygenierung und folgende Dehydrogenierung unter Bildung von 3,4-, 3,5- bzw. 3,6-Dichlorbrenzkatechin als zentrale Zwischenprodukte einleiten (de Bont et al., 1986; Spain und Nishino, 1987; Haigler et al., 1988; Oltmanns et al., 1988). Van der Meer et al. isolierten den ersten 1,2,4-Trichlorbenzol mineralisierenden Stamm *Pseudomonas* sp. P51, welcher zudem alle Dichlorbenzole als Wachstumssubstrat nutzen kann (van der Meer et al., 1987). In diesem Stamm wurden die degradativen Enzyme als auf dem katabolischen Plasmid pP51 kodiert lokalisiert. Die initialen Reaktionen sind hier ebenfalls eine Dioxygenierung und eine Dehydrogenierung und führen zur Bildung von chlorierten Brenzkatechinen (van der Meer et al., 1991).

Sander et al. (Sander et al., 1991) isolierten die Stämme *Burkholderia* (*Pseudomonas*) sp. PS12 und PS14, welche Chlorbenzol, alle drei Isomere des Dichlorbenzols, 1,2,4-Trichlorbenzol und 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol abbauen können (Daß 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol nicht nur durch PS14 sondern auch durch PS12 mineralisiert werden kann, wurde kürzlich von Beil et al. (Beil et al., 1997) beschrieben). Auch hier erfolgt zunächst eine Dioxygenierung des aromatischen Ringes. Im Falle des Angriffs am 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol erfolgt eine Dioxygenierung an einem chloresubstituierten Kohlenstoffatom. Das gebildete Dioxygenierungsprodukt ist instabil und rearomatisiert spontan unter Chlorideliminierung zu 3,4,6-Trichlorbrenzkatechin, so daß für den Abbau keine Dehydrogenierung notwendig ist (Beil et al., 1997). Sämtliche anderen Chlorbenzole werden, wenn sie Substrate darstellen, zu Dihydrodiolen und durch eine Dehydrogenierung zu Chlorbrenzkatechinen umgesetzt (siehe Abbildung 3).

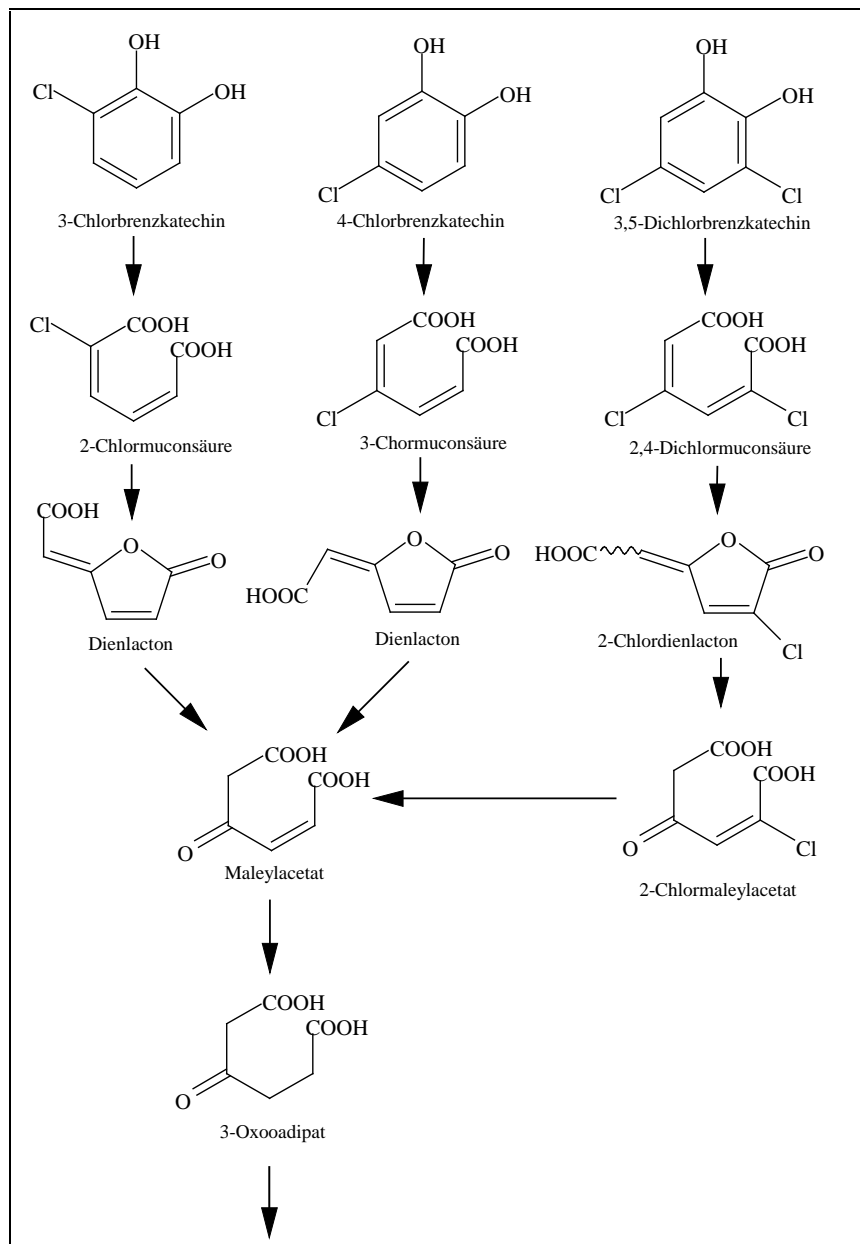
Eine weitere theoretische Möglichkeit des Abbaus von Chlorbenzol ergibt sich aus Arbeiten von Yen et al.. Sie wiesen auf eine Monooxygenierung des Chlorbenzols durch die Toluol 4-Monooxygenase des Stammes *Pseudomonas mendocina* KR1 hin (Yen et al., 1991).

Da eine Vielzahl von Chlorphenol mineralisierenden Mikroorganismen beschrieben wurde, ist somit ein Abbau über zwei sukzessive Monooxygenierungen mit Chlorbrenzkatechin als Intermediat denkbar. Ein entsprechender vollständiger Abbauweg wurde bisher jedoch nicht nachgewiesen.

1.7 Chlorierte Brenzkatechine

Die chlorierten Brenzkatechine stehen als zentrale Metabolite nicht nur bei den Chlorbenzolen sondern grundsätzlich im Mittelpunkt des Abbaus chlorierter Aromaten. Der Abbau der chlorierten Brenzkatechine (siehe Abbildung 4) erfolgt in der Regel und bei sämtlichen oben beschriebenen Chlorbenzol verwertenden Mikroorganismen über den modifizierten *ortho*-Weg, wobei Chlorbrenzkatechine mittels intradioler Spaltung durch die Chlorbrenzkatechin 1,2-Dioxygenase zu Chlormuconsäuren umgesetzt werden (Dorn und Knackmuss, 1978a; Dorn und Knackmuss, 1978b).

Diese werden folgend unter Chlorideliminierung durch Chlormuconsäure Cycloisomerasen zu Dienlactonen umgesetzt (Schmidt und Knackmuss, 1980). Entgegen früheren Annahmen (Schmidt und Knackmuss, 1980) ist diese Chlorideliminierung keine spontane Reaktion, sondern enzymkatalysiert (Vollmer et al., 1994; Blasco et al., 1995). Während sich Chlorbrenzkatechin Dioxygenasen und Brenzkatechin Dioxygenasen in der Tat nur bezüglich ihrer Substratspezifität unterscheiden, konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, daß Chlormuconsäure Cycloisomerasen und Muconsäure Cycloisomerasen verschiedene Reaktionen katalysieren. So katalysiert nur die Chlormuconsäure Cycloisomerase eine Dehalogenierung von 2-Chlormuconsäure (Vollmer und Schlömann, 1995), während die Muconsäure Cycloisomerase dieses Substrat zu 2-Chlor- und 5-Chlormuconolacton cycloisomerisiert (Vollmer et al., 1994). 3-Chlormuconsäure wird durch beide Enzyme dehalogeniert. Während jedoch Dienlacton das Produkt einer Chlormuconsäure Cycloisomerase katalysierten Cycloisomerisierung darstellt, bilden Muconsäure Cycloisomerasen das decarboxylierte Produkt Protoanemonin (Blasco et al., 1995). Der Abbau chlorierter Brenzkatechine und von Brenzkatechin divergiert somit auf der Stufe des gebildeten Lactons. Dienlactone als Intermediate des modifizierten *ortho*-Weges werden durch Dienlacton Hydrolasen umgesetzt (Schmidt und Knackmuss, 1980), während das Muconolacton des 3-Oxadipat-Weges nach Isomerisierung durch die Muconolacton Isomerase zu Enollacton einer Hydrolyse durch die Enollacton Hydrolase unterliegt (Ornston, 1966). Das durch Dienlacton Hydrolase gebildete Maleylacetat wird durch die Maleylacetat Reduktase zu 3-Oxadipat, dem gemeinsamen Intermediat des 3-Oxadipat-Weges und modifizierten *ortho*-Weges, reduziert und anschließend in den Tricarbonsäure-Zyklus eingeschleust (Reineke und Knackmuss, 1984; Schlömann, 1988). Während die für Enzyme des 3-Oxadipat Abbauweges kodierenden Gene in der Regel chromosomal kodiert sind, wurden die für Enzyme des Chlorbrenzkatechin Abbaus kodierenden Gene bisher nur auf Plasmiden nachgewiesen (Chatterjee et al., 1981; van der Meer et al., 1991).

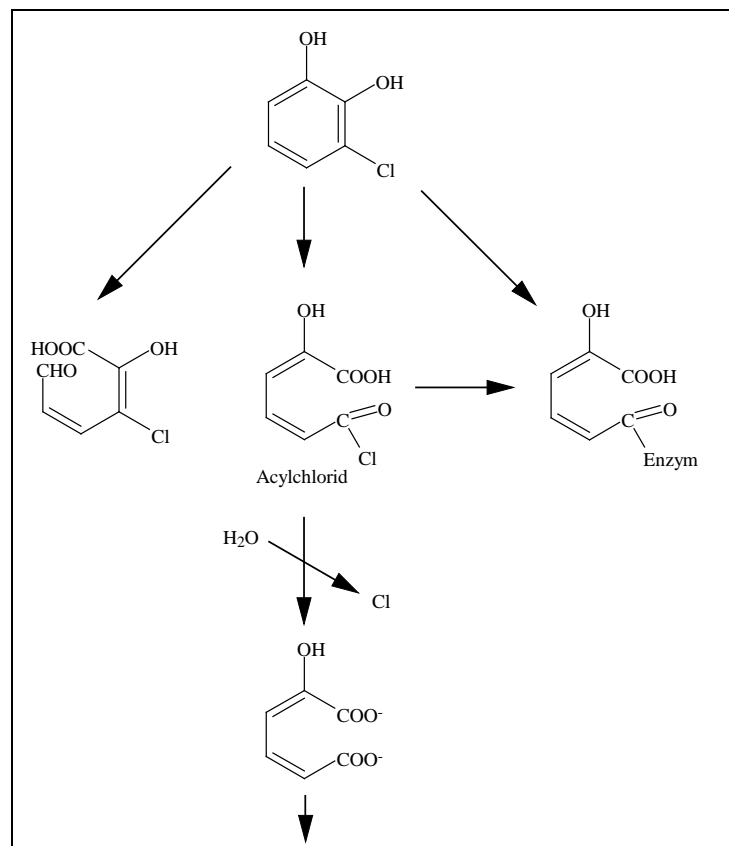
Abbildung 4: Abbau von Chlorbrenzkatechinen

Probleme treten auf, wenn chlorierte Brenzkatechine in den *meta*-Weg geschleust werden. So wird z.B. 4-Chlorbrenzkatechin durch Brenzkatechin 2,3-Dioxygenasen zu 2-Hydroxy-5-chlormuconsäure-semialdehyd gespalten (Wieser et al., 1994), welches in der Regel ein dead-end Produkt darstellt. Darauf, daß eine Mineralisierung chlorierter Brenzkatechine jedoch auch nach *meta*-Spaltung erfolgen kann, deuten Arensdorf und Focht hin. Diese isolierten den 4-Chlorbiphenyl-Abbauer *Pseudomonas cepacia* P166, welcher 4-Chlorbiphenyl über 4-Chlorbenzoat und 4-Chlorbrenzkatechin abbauen kann (Arensdorf und Focht, 1994). Die Autoren beschrieben den weiteren Metabolismus des Semialdehyds durch Dehydrogenierung zur 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure, und über die Intermediate 5-Chlor-2-hydroxy-pent-2,4-diensäure und 5-Chlor-4-hydroxy-oxopentansäure, gefolgt von einer

Spaltung zu Chloracetaldehyd/-säure und Pyruvat, welches in den Tricarbonsäure-Zyklus geschleust wird (Arendsdorf und Focht, 1995).

Auch das Einschleusen von 3-Chlorbrenzkatechin in den *meta*-Weg erwies sich als problematisch (siehe Abbildung 5).

Abbildung 5: Metabolismus von 3-Chlorbrenzkatechin durch *meta*-Spaltung



Klecka et al. beschrieben eine reversible Inaktivierung der Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase durch Komplexierung des Eisens aus dem katalytischen Enzymzentrum mit 3-Chlorbrenzkatechin (Klecka und Gibson, 1981). Noch drastischere Effekte wurden beobachtet, wenn Brenzkatechin 2,3-Dioxygenasen in der Lage sind, 3-Chlorbrenzkatechin zu spalten. Die irreversible Inaktivierung der Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* mt-2 führten Bartels et al. auf die Bildung hochreaktiven Acylchlorids durch 2,3-Spaltung zurück (Bartels et al., 1984). Die Autoren nahmen an, daß das Acylchlorid durch Bindung an das Protein dieses inaktiviert. Eine alternative Hydrolyse des Acylchlorids zu 2-Hydroxymuconsäure wurde nur in untergeordnetem Maße beobachtet. Jedoch wurden inzwischen auch Proteine beschrieben, die 3-Chlorbrenzkatechin extradiol spalten und keiner Suizidinaktivierung unterliegen. So charakterisierten Heiss et al. eine extradiol Dioxygenase des Stammes *Sphingomonas* sp. BN6, welche 3-Chlorbrenzkatechin zwischen C₁ und C₆ zu 3-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd spaltet (Heiss et al., 1997). Eine entsprechende Reaktion (Prucha, persönliche Mitteilung) katalysieren auch die Proteine C₂ und C₃ des Biphenyl verwertenden Stammes

Rhodococcus globerulus P6. Interessanterweise zeichnen sich die Enzyme C₂ und C₃ als auch das des Stammes *Sphingomonas* sp. BN6 im Gegensatz zu sämtlichen anderen Brenzkatechin 2,3-Dioxygenasen durch ein deutlich geringeres Molekulargewicht der Untereinheiten aus (Asturias und Timmis, 1993; Heiss et al., 1997). Ein Abbau von Chlorbenzol über 3-Chlorbrenzkatechin und anschließende *meta*-Spaltung wurde kürzlich von Mars et al. beschrieben (Mars et al., 1997). Die in den Abbau involvierte Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase wurde von Kaschabek et al. charakterisiert und 2-Hydroxymuconsäure als Ringspaltungsprodukt nachgewiesen (Kaschabek et al., 1998). Es ist anzunehmen, daß hier, im Gegensatz zum *Pseudomonas putida* mt-2 Enzym, eine Hydrolyse des gebildeten Acylchlorids der Reaktion mit Aminosäureseitenketten des Enzyms bevorzugt ist. Die gebildete 2-Hydroxymuconsäure wird über klassische Reaktionen des *meta*-spaltenden Abbauweges in den Tricarbonsäure-Zyklus eingeschleust.

1.8 Substratmischungen

Die meisten der Laboruntersuchungen, welche sich mit dem BTX-Abbau beschäftigen, spezialisieren sich auf eine einzelne Substanz, ohne dabei zu beachten, daß Umweltverschmutzungen durch eine einzelne Komponente der BTX-Gemische in realen Situationen eher unwahrscheinlich sind. Obwohl alle Bestandteile des BTX-Gemisches einzeln durch natürliche Organismen mineralisiert werden können, ist ein vollständiger Abbau über einen Weg in der Regel nicht erreichbar.

Biochemische Studien zum *tod*-Abbauweg haben gezeigt, daß der unvollständige Abbau des BTX-Gemisches auf Akkumulation des 3,6-Dimethylbrenzkatechins, welches ein Endprodukt des *tod*-Abbauweges aus *p*-Xylol darstellt, zurückzuführen ist (Gibson et al., 1974). *o*- und *m*-Xylol unterliegen nach eigenen Untersuchungen einer Monooxygenierung zu den entsprechenden Benzaldehyden, welche nur sehr langsam weiter umgesetzt werden (siehe Abschnitt 3.1.3).

o-Xylol wird, wie oben beschrieben, durch zwei sukzessive Monooxygenierungen über 2,3- und 3,4-Dimethylphenol und über 3,4- bzw. 4,5-Dimethylbrenzkatechin und folgende *meta*-Spaltung mineralisiert. *m*- und *p*-Cresol können durch den *o*-Xylol Verwerter *Pseudomonas stutzeri* OX1 zu 2,4- bzw. 2,5-Dimethylphenol kometabolisiert werden (di Lecce et al., 1997). Entsprechend werden Xylole durch den Stamm *Pseudomonas pickettii* PK01 zu den korrespondierenden Dimethylphenolen kometabolisiert (Olsen et al., 1994). Dimethylphenole können wiederum (auf eine Diskussion der möglichen Methylgruppenoxidationen soll hier nicht eingegangen werden) durch Phenol Hydroxylasen zu Dimethylbrenzkatechinen umgewandelt werden (Shingler et al., 1989; Pieper et al., 1995), über deren Verbleib keine systematischen Studien vorliegen.

Nur für 3,4-Dimethylbrenzkatechin ist eine Mineralisierung nach *meta*-Spaltung aus der Literatur ersichtlich (Assinder und Williams, 1990; Shingler et al., 1992; Barbieri et al., 1993). Pieper et al. zeigten, daß Dimethylbrenzkatechine zwar einer *ortho*-Spaltung unterliegen, jedoch Dimethylmuconolactone als dead-end Metabolite akkumulieren. Zudem deuten die Studien darauf hin, daß 3,5-Dimethylbrenzkatechin kein Substrat zumindest für die *meta*-spaltenden Enzyme des Stammes *Ralstonia eutropha* JMP134 darstellt (Pieper et al., 1995).

Es wird deutlich, daß selbst wenn ein mikrobielles Konsortium verwendet wird, Substrat-Interaktionen negativen Einfluß auf die komplette Biodegradation des BTX-Gemisches ausüben können (Alvarez und Vogel, 1991; Lim et al., 1994; Oh et al., 1994). Dies kann ausgelöst sein durch Inhibition aktiver Zentren der Enzyme durch weitere nicht umsetzbare Substrate, durch kompetitive Hemmung, durch Produktion von Endmetaboliten, welche durch die verschiedenen Enzyme nicht weiter umgesetzt werden können, oder durch Fehlleitung von Substraten und Umsetzung in unproduktive Nebenwege.

Ein zusätzliches Problem im Abbau ergibt sich, wenn neben den schon erwähnten BTX chlorierte Aromaten als umweltverschmutzende Substanzen auftreten. Der gleichzeitige Abbau methylierter und chlorierter Aromaten stellt sich aufgrund der verschiedenen Abbauewege als schwierig dar. Die methylierten Substrate werden wie oben beschrieben in der Regel über den *meta*-Weg abgebaut, wohingegen die chlorierten Aromaten in der Regel über den modifizierten *ortho*-Weg gespalten werden müssen. In Anwesenheit von chlorierten Substraten kommt es teilweise zur Inaktivierung des *meta*-Weges. Dies führt dazu, daß alle vorhandenen Substrate, auch unchlorierte, methylierte Substrate in den *ortho*-Weg geleitet werden und folglich zur Akkumulation von dead-end Metaboliten führen (Knackmuss, 1984).

Zwar sind einige der gebildeten Produkte durch andere Mikroorganismen abbaubar, so daß eine Mineralisierung durch Kokulturen erfolgen kann, jedoch stellt der Kometabolismus methylierter Analoga für die Chloraromaten verwertenden Organismen eine hohe energetische Last dar. So sind nur bestimmte Mischungsverhältnisse durch Kokulturen mineralisierbar (Taeger et al., 1988). Zudem können variierende Belastungen an Methyl- und Chloraromaten durch entsprechende Kulturen nicht toleriert werden. Interessante Mikroorganismen in Hinblick auf einen Simultanabbau von Chlor- und Methyларomaten sind die Chlorbenzol mineralisierenden Stämme *Pseudomonas* sp. JS150 (Haigler et al., 1992) und *Pseudomonas putida* GJ31 (Oldenhuis et al., 1989). Erster kann neben Chlorbenzol auch Toluol nach *ortho*-Spaltung mit 2-Methylmuconolacton als Intermediat mineralisieren, während letzterer sowohl Chlorbenzol als auch Toluol über einen *meta*-spaltenden Abbaueweg mineralisiert.

1.9 Chlormethylaromaten

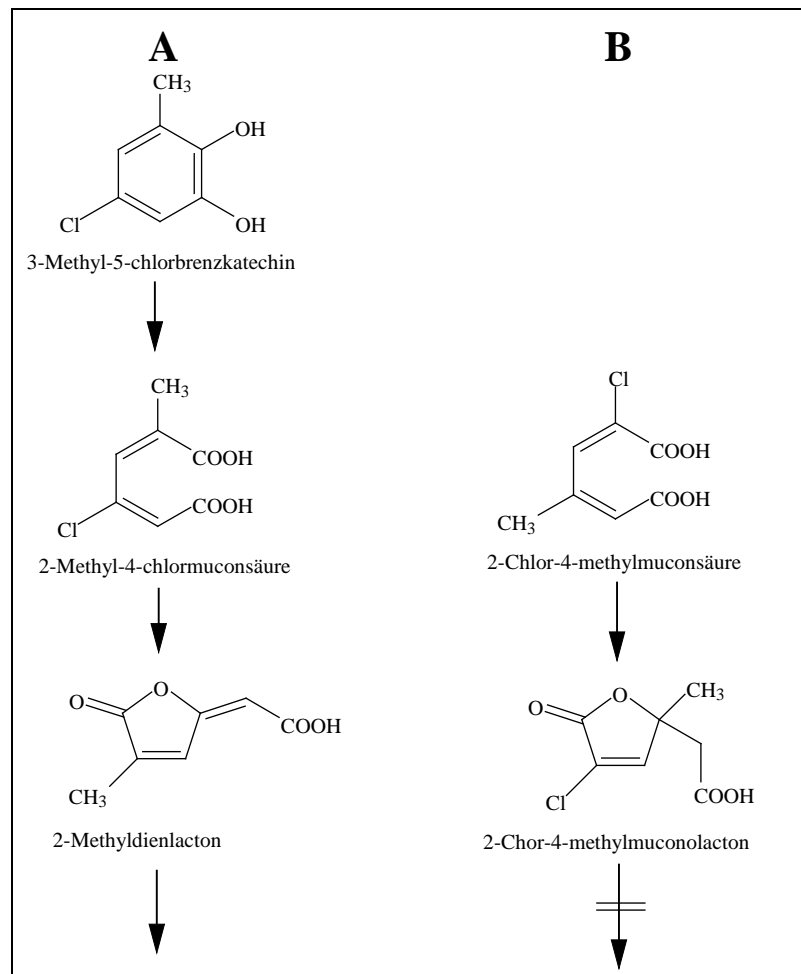
Ebenso kann der Abbau von Substanzen, welche zusätzlich zu Methylgruppen noch Chlorsubstituenten in einem Molekül vereinigen, erschwert sein. In diesen Fällen stellt sich die Frage, welcher Abbauweg gewählt werden kann, da wie schon beschrieben, Enzyme des *meta*-Abbauweges mit methylierten Substraten umgehen können, und die Enzyme des modifizierten *ortho*-Abbauweges die chlorierten Intermediate spalten und abbauen können.

Die erste Untersuchung zum Abbau von Chlormethylaromaten wurde an der Verbindung 2-Methyl-4-chlorphenoxyessigsäure (Gaunt und Evans, 1971a; Gaunt und Evans, 1971b), einem Herbizid durchgeführt. Sie wird über einen modifizierten *ortho*-spaltenden Abbauweg mineralisiert. Hierbei unterliegt das Intermediat 3-Methyl-5-chlorbrenzkatechin einer Spaltung zu 2-Methyl-4-chlormuconsäure. Die symmetrisch aufgebauten Muconsäuren können sowohl einer 1,4- als auch einer 3,6-Cycloisomerisierung unterliegen. Es ist davon auszugehen, daß diese Muconsäure einer Cycloisomerisierung zum Chlorsubstituenten hin unterliegt, welche mit einer Eliminierung von Chlorid und der Produktion von Methyldienlacton einhergeht (Gaunt und Evans, 1971b) (siehe Abbildung 6A). Methylsubstituierte Dienlactone sind durch Dienlacton Hydrolasen des modifizierten *ortho*-Weges umsetzbar (Maltseva et al., 1994; Prucha et al., 1996), im Gegensatz zu methylsubstituierten Muconolactonen/Enollactonen als Substrate der Muconolacton Isomerase/Enollacton Hydrolase, so daß eine Mineralisierung erfolgen kann.

Die Tatsache, daß 2-Chlor-4-methylphenoxyessigsäure im Gegensatz zu 2-Methyl-4-chlorphenoxyessigsäure durch *Ralstonia eutropha* JMP134 nicht mineralisiert werden kann, wurde von Pieper et al. vor allem darauf zurückgeführt, daß intermediäre 2-Chlor-4-methylmuconsäure zum dead-end Produkt 2-Chlor-4-methylmuconolacton cycloisomerisiert wird und somit eine Cycloisomerisierungsrichtung eingeschlagen wird, die nicht mit einer Chlorideliminierung einhergehen kann (Pieper et al., 1993) (siehe Abbildung 6B).

Aufgrund der beobachteten Cycloisomerisierungsrichtung verschiedener mono- und disubstituierter Brenzkatechine, die grundsätzliche Vorhersagen über die Cycloisomerisierung verschiedener Chlormethylmuconsäuren erlaubt, stellte sich erstmalig die Frage, ob Chlortoluole über Chlormethylbrenzkatechine als Intermediate mineralisierbar sind.

Ein dioxygenolytisch initialisierter Abbau von 4-Chlortoluol, wie von Haigler et al. beschrieben (Haigler und Spain, 1989), sollte zur Bildung von 2-Methyl-5-chlormuconsäure und nach 1,4-Cycloisomerisierung zu biologisch abbaubarem 2-Methyldienlacton führen. Entsprechend sollte eine Dioxygenierung von 3-Chlortoluol zu 2-Methyl-4-chlormuconsäure und/oder 2-Chlor-4-methylmuconsäure führen, wobei ersteres unter Chlorideliminierung zu Methyldienlacton, letzteres jedoch zu Chlormethylmuconolacton umgewandelt werden sollte. Ebenso kann bei den aus 2-Chlortoluol als Intermediat angenommenen 2-Methyl-3-chlormuconsäure und 2-Chlor-3-methylmuconsäure vermutet werden, daß ersteres zu Methyldienlacton, letzteres jedoch zu einem dead-end Metaboliten cycloisomerisiert wird.

Abbildung 6: Theorie zum Abbau von Chlormethylaromaten

1.10 Experimentelle Evolution katabolischer Abbauwege

Obwohl Mikroorganismen im Boden und Wasser ein beträchtliches evolutionäres Potential besitzen, ist die Evolution effektiver Abbauwege für bestimmte Substanzen sehr langsam. Kürzlich eingeführte genetische Manipulationstechniken (engineering) eröffnen beachtliche Aussichten, um die Evolution der gewünschten metabolischen Abbauwege voranzutreiben. Zwei generelle Strategien können für die experimentelle Evolution neuer katabolischer Aktivitäten anvisiert werden: Die Restrukturierung bestehender Abbauwege oder die Zusammensetzung eines neuen Hybridweges durch die Kombination geeigneter Sektionen verschiedener Abbauwege.

Diese Strategien wurden schon erfolgreich bei der Konstruktion neuer Abbauwege angewendet. Zum Beispiel wurde von Lee et al. (Lee et al., 1995) ein *Pseudomonas putida*-Hybridstamm konstruiert, welcher durch die Kombination von *tol*- und *tod*-Abbauweg zur Mineralisierung von Benzol, Toluol und *p*-Xylol befähigt wurde. Sie konjugierten ein Plasmid, welches die Gene *todC1C2BA* enthielt, in *Pseudomonas putida* mt-2. Dieser Stamm ist in der Lage, Benzol und Toluol über die

korrespondierenden Dihydrodirole und Toluol und *p*-Xylol über die korrespondierenden Benzoate als Zwischenprodukte zu mineralisieren. Obwohl von den Autoren nicht explizit erwähnt, ist davon auszugehen, daß der Erfolg dieses Hybridstammes auf die geringe Aktivität der Toluol Dioxygenase und somit einer reprimierten Fehlleitung von *p*-Xylol in den entsprechenden Abbauweg zurückzuführen ist.

Ein Hybridstamm WR1313 zum Abbau von Chlorbenzol wurde von Weisshaar et al. durch eine Konjugation zwischen *Pseudomonas putida* F1 (*tod*-Abbauweg) und *Pseudomonas* sp. B13 (Chlorbrenzkatechin-Abbauweg) konstruiert (Weisshaar et al., 1987). Oltmanns et al. selektionierten den Stamm WR1323 nach Adaptation des Stammes WR1313 auf Wachstum mit 1,4-Dichlorbenzol (Oltmanns et al., 1988).

Ebenfalls durch Zusammenfügen unspezifischer Initialenzyme mit der zentralen Chlorbrenzkatechin mineralisierenden Enzymsequenz konstruierten Brinkmann und Reineke Stämme, welche ein Wachstum mit 3-Chlor-, 4-Chlor- und 3,5-Dichlortoluol aufweisen. Dazu transferierten sie das TOL Plasmid pWW0 des Stammes *Pseudomonas putida* PaW1 in die Stämme *Pseudomonas* sp. B13 und *Pseudomonas cepacia* JH230, welche zur Mineralisierung von Chlorbrenzkatechin befähigt sind (Brinkmann und Reineke, 1992). Die Enzyme Xylol Oxygenase, Benzylalkohol Dehydrogenase und Benzaldehyd Dehydrogenase des oberen Toluol-Abbauweges des TOL Plasmides sind in der Lage, 4-Chlortoluol zu 4-Chlorbenzoat, welches als Substrat der ebenfalls TOL Plasmid kodierten Toluat Dioxygenase dient, zu oxidieren (Harayama et al., 1984; Harayama et al., 1986). Analog wird 3-Chlortoluol durch diese Hybridstämme über 3-Chlorbenzoat als Intermediat abgebaut.

Im Rahmen dieser Untersuchungen arbeiten Brinkmann et al. mit drei verschiedenen Benzoat umsetzenden Enzymsystemen. Der Stamm *Pseudomonas* sp. B13 enthält eine klassische Benzoat Dioxygenase, welche außer Benzoat auch 3-Chlorbenzoat mit signifikanter Aktivität umsetzt, jedoch keine Aktivität mit 2- und 4-Chlorbenzoat aufweist (Reineke und Knackmuss, 1978). Die Toluat Dioxygenase des Stammes *Pseudomonas putida* mt-2 weist eine hohe Aktivität mit *meta*- und *para*-substituierten Benzoaten auf, toleriert jedoch keinen Substituenten in *ortho*-Position (Reineke und Knackmuss, 1978). Der Stamm *Pseudomonas cepacia* JH230 enthält eine Benzoat Dioxygenase, die in der Lage ist, auch 2-Chlorbenzoat umzusetzen, und kann somit mit 2-Chlorbenzoat als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen. Im Gegensatz zu sämtlichen anderen bisher isolierten 2-Chlorbenzoat verwertenden Mikroorganismen, bei denen ein Abbau über eine 1,2-Dioxygenierung, spontaner Dechlorierung und Decarboxylierung mit Brenzkatechin als Intermediat angenommen wird, vermuten Hartmann et al. eine 1,6-Dioxygenierung von 2-Chlorbenzoat durch *Pseudomonas cepacia* JH230 und 3-Chlorbrenzkatechin als Zwischenprodukt (Hartmann et al., 1989).

Auch für schwer abbaubare Mischungen aus Halo- und Alkylaromaten konnten neue Abbauwege geschaffen werden (Rojo et al., 1987). Hierzu wurden Chloraromaten verwertende Mikroorganismen mit Abbauwegsegmenten komplettiert, die eine Mineralisierung zumindest ausgewählter Methylaromaten nach *ortho*-Spaltung ermöglichen. Die konstruierten Stämme erwiesen sich nicht nur

zu einem Simultanabbau von Chlor- und Methyларomaten fähig, sondern schützten natürliche Bakteriengemeinschaften vor Schockbelastungen (Erb et al., 1997).

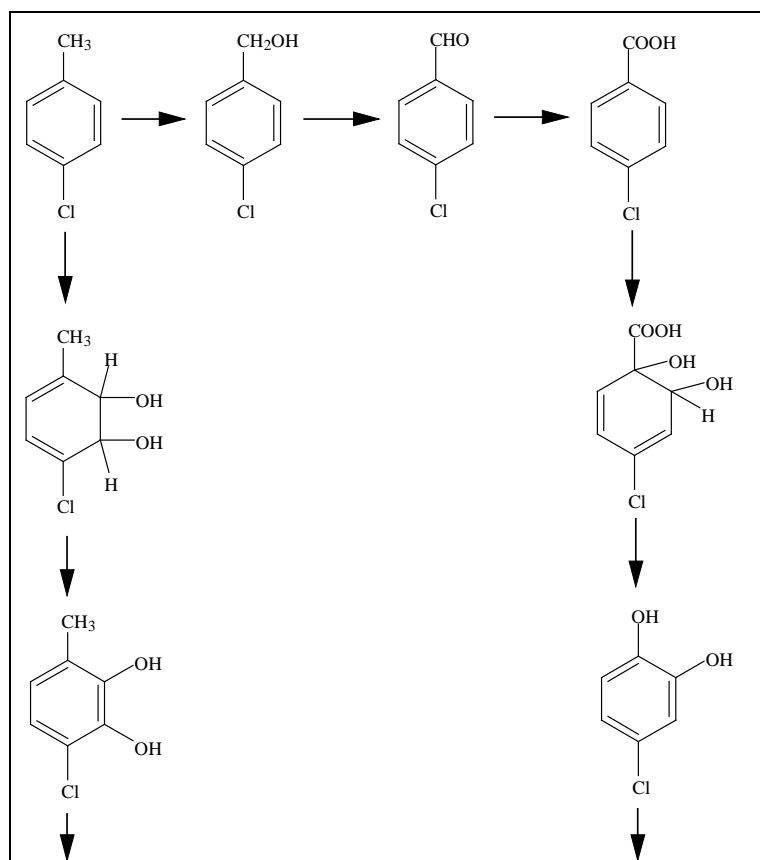
1.11 Chlortoluole

Während, wie oben dargestellt, viele Arbeiten zum Abbau von Toluol, Xylen (*meta*), und auch Chlorbenzolen (*ortho*) veröffentlicht wurden, findet man in der Literatur nur wenige Arbeiten über den Abbau der gemischt substituierten Chlortoluole.

Vandenbergh (Vandenbergh et al., 1981) berichtete über Bakterien, welche zum Abbau von mono- bzw. dichlorierten Toluolen befähigt sind, ohne Angaben zu Abbauwegen zu geben.

Für die Mineralisierung von 4-Chlortoluol wurden zwei verschiedene metabolische Wege beschrieben. Ein Weg, welcher in Analogie zum Chlorbenzol Abbau über eine initiale Dioxygenierung und Dehydrogenierung durch eine Dihydrodiol Dehydrogenase unter Bildung eines 3-Chlor-6-methylbrenzkatechins mit anschließender Mineralisierung über einen modifizierten *ortho*-Spaltungsabbauweg verläuft, wurde in *Pseudomonas* sp. JS21 (Haigler und Spain, 1989) nachgewiesen. Wie oben dargestellt beschrieben Brinkmann und Reineke einen Abbau von 4-Chlortoluol nach initialer Oxidation der Methylseitenkette zum 4-Chlorbenzoat (Brinkmann und Reineke, 1992).

Abbildung 7: Mögliche 4-Chlortoluol Abbauwege



Im Gegensatz zu 3- und 4-Chlortoluol, welche wie oben erwähnt durch die Hybridstämme von Brinkmann et al. metabolisiert werden können, wurde bisher kein Abbauweg für 2-Chlortoluol beschrieben. Im Fall des durch Brinkmann et al. (Brinkmann und Reineke, 1992) konstruierten Abbauweges beruht dies auf der Unfähigkeit der Xylol Monooxygenase, 2-Chlortoluol anzugreifen.

Der Transfer des TOL-Plasmides in den Stamm JH230, welcher zum Wachstum mit 2-Chlorbenzoat befähigt ist, resultierte in Abkömmlingen, welche 2-Chlorbenzylalkohol mineralisieren. Dies zeigte, daß die Aktivität der TOL Plasmid kodierten Benzylalkohol und Benzaldehyd Dehydrogenase mit einer in *ortho*-Stellung chloresubstituierten Substanz trotz zuvor beschriebener geringer Umsatzraten, welche wahrscheinlich auf eine Hinderung der Reaktion durch Substituenten in *ortho*-Stellung beruht (Brinkmann und Reineke, 1992), groß genug war, um eine effektive Transformation zu 2-Chlorbenzoat zu katalysieren.

Der 1,2,4-Trichlorbenzol-abbauende Stamm *Burkholderia* sp. PS12 wurde beschrieben, nicht nur eine Reihe von chloresubstituierten Benzolen, sondern ebenso 4-Chlor- und einige Dichlortoluole mineralisieren zu können. 2-Chlor- sowie 3-Chlortoluol waren keine Wachstumssubstrate (Sander et al., 1991). Die Aktivierung des aromatischen Ringsystems erfolgt durch eine Tetrachlorbenzol Dioxygenase, mit breitem Substratspektrum, die in der Lage ist, Dichlorbenzole, 1,2,4-Trichlorbenzol und 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol anzugreifen (Beil et al., 1997). Entsprechend unterliegt auch 4-Chlortoluol einer Dioxygenierung, so daß ein Abbauweg ähnlich dem von Haigler und Spain (Haigler und Spain, 1989) beschriebenen, für den 4-Chlortoluol Abbau durch PS12 angenommen werden kann. In Analogie wurde zunächst eine Dioxygenierung auch von 2- und 3-Chlortoluol angenommen und die Ursache für fehlendes Wachstum in der Regioselektivität der Dioxygenierung und folgender Akkumulation von dead-end Chlormethylmuconolactonen vermutet. Überraschenderweise unterlagen 2-Chlortoluol und 3-Chlortoluol jedoch einer Monooxygenierung der Methylseitengruppe zum entsprechenden Alkohol, welcher nur sehr langsam zur Carbonsäure aufoxidiert wird (Lehning et al., 1997). Das aus 3-Chlortoluol gebildete 3-Chlorbenzoat kann von PS12 als Wachstumssubstrat genutzt werden. Da aber 3-Chlortoluol nicht als alleinige C-Quelle verwertet wird, ist anzunehmen, daß die Geschwindigkeit der Oxidation zur Carbonsäure für ein Wachstum nicht ausreicht. 2-Chlorbenzoat als Produkt der Oxidation von 2-Chlortoluol wird nicht verwertet (Lehning et al., 1997).

Pseudomonas putida F1 baut Toluol über einen Weg ähnlich dem Chlorbenzol-Abbau von PS12 ab, d. h. Dioxygenierung des aromatischen Ringes (Gibson et al., 1974; Yeh et al., 1977), gefolgt von einer Dehydrogenierung unter Bildung des korrespondierenden Brenzkatechins (Rogers und Gibson, 1977).

Der Metabolismus von 2-Chlortoluol durch diesen Stamm ist gleich dem bei PS12 beobachteten. Toluol verwertende Zellen zeigen eine schnelle Transformation des 2-Chlortoluols zum 2-Chlorbenzylalkohol mit langsamer Oxidation zum korrespondierenden Benzoat. Ebenso wird 3-Chlortoluol schnell zum entsprechenden Alkohol oxidiert und langsam zum 3-Chlorbenzoat, welches aber im Gegensatz zum Stamm PS12 kein Wachstumssubstrat für F1 darstellt (Lehning et al., 1997).

Bei der Analyse des Abbaus von Nitrotoluolen durch die Toluol Dioxygenase des Stammes *Pseudomonas putida* F1 beobachteten Robertson et al., daß 4-Nitrotoluol am aromatischen Ring dioxygeniert wird, während 2- und 3-Nitrotoluol einer Monooxygenierung der Seitenkette zu den entsprechenden Nitrobenzylalkoholen unterliegen (Robertson et al., 1992), Reaktionen, die denen durch F1 und PS12 beim Umsatz von Chlortoluolen entsprechen.

Diese Analogie führte zu der Annahme, daß die Toluol Dioxygenase und die Tetrachlorbenzol Dioxygenase für diesen Reaktionsschritt verantwortlich sind. Dies wurde mit Hilfe des Stammes *Escherichia coli* JM109 pDTG601, welcher die klonierte Dioxygenase (*todC1C2BA*) von *Pseudomonas putida* F1 in dem Expressionsvektor pKK223-3 unter der Kontrolle des *tac* Promoters enthält, getestet. 2- bzw. 3-Chlortoluol unterlagen einer bevorzugten Monooxygenierung der Methylgruppe unter Bildung von 2- bzw. 3-Chlorbenzylalkohol, während nur sehr geringe Mengen methyl- und chloresubstituierte 2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzole als Produkt einer Dioxygenierungsreaktion nachweisbar waren (Lehning et al., 1997).

Entsprechende Versuche mit der klonierten Tetrachlorbenzol Dioxygenase des Stammes *Burkholderia* sp. PS12 zeigten inzwischen analoge Ergebnisse (Beil, persönliche Mitteilung).

Somit sind die Toluol Dioxygenase von *Pseudomonas putida* F1 und die Tetrachlorbenzol Dioxygenase von *Burkholderia* sp. PS12 die ersten Enzyme für die eine signifikante Umsatzaktivität mit 2-Chlortoluol als Substrat beschrieben wurde. Dies eröffnet, zumindest theoretisch, die Möglichkeit, Stämme zu entwickeln, die 2-Chlortoluol mineralisieren können.

1.12 Segmente zum Abbau von Chlortoluolen

Die Segmente der Abbauewege, welche für die Mineralisierung aller monochlorierten Toluole benötigt werden, sind bekannt. Um die Problematik des simultanen Abbaus der drei verschiedenen Chlortoluole zu lösen, werden unterschiedliche Abbaufähigkeiten aus diversen Stämmen benötigt.

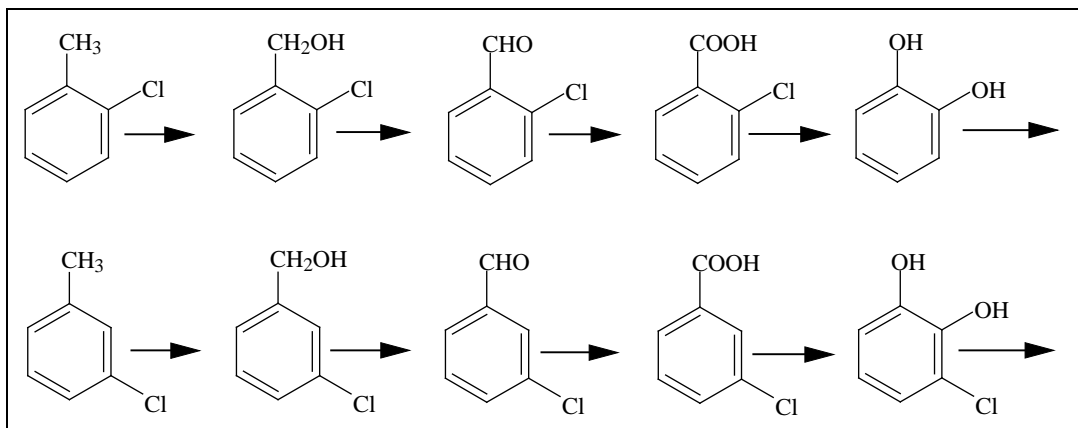
Die Mineralisierung von 2-Chlortoluol erfordert mindestens vier verschiedene Abbausequenzen.

1. Eine Chlorbenzol oder Toluol Dioxygenase, welche die Methylgruppe des 2-Chlortoluols unter Bildung eines 2-Chlorbenzylalkohols oxidiert.
2. Eine Benzylalkohol und eine Benzaldehyd Dehydrogenase, welche die Alkohol-Seitenkette des 2-Chlorbenzylalkohols mit signifikanter Aktivität zur Carbonsäure aufoxidieren.
3. Eine 2-Chlorbenzoat Dioxygenase, welche 2-Chlorbenzoat zu Brenzkatechin metabolisiert.
4. Enzyme zum Abbau von Brenzkatechin, d. h. z. B. eine Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase und Folgeenzyme, oder eine Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase mit Folgeenzymen.

Für die Mineralisierung von 3-Chlortoluol benötigt man ebenfalls verschiedene Abbausequenzen.

1. Die initiale Oxidation der Methylgruppe des 3-Chlortoluols unter Bildung von 3-Chlorbenzylalkohol kann klassisch durch die Xylol Monooxygenase aber auch durch die Chlorbenzol oder Toluol Dioxygenase katalysiert werden.
2. Eine Benzylalkohol und eine Benzaldehyd Dehydrogenase, welche die Alkohol-Seitenkette des 3-Chlorbenzylalkohols zur Carbonsäure aufoxidieren.
3. Im Gegensatz zum Abbau von 2-Chlorbenzoat, für welchen eine spezifische 2-Chlorbenzoat Dioxygenase notwendig ist, kann 3-Chlorbenzoat durch *Pseudomonas* stämmige Benzoat Dioxygenasen und Dihydrodiol Dehydrogenasen zu 3-Chlorbrenzkatechin umgewandelt werden.
4. Enzyme zum Abbau von 3-Chlorbrenzkatechin, d. h. Enzyme des Chlorbrenzkatechin Abbauweges.

Abbildung 8: Theoretischer Abbau von 2- und 3-Chlortoluol



Die Mineralisierung von 4-Chlortoluol kann über zwei verschiedene Abbauewege erfolgen, entweder durch

1. eine Chlorbenzol oder Toluol Dioxygenase mit folgender Dehydrogenierung zu 3-Chlor-6-methylbrenzkatechin und anschließender
2. Mineralisierung durch Enzyme des Chlorbrenzkatechin Abbauweges

oder durch

1. die Xylol Monooxygenase, Benzylalkohol Dehydrogenase und Benzaldehyd Dehydrogenase des oberen Toluol Abbauweges unter Produktion von 4-Chlorbenzoat, welches
2. durch die Toluat Dioxygenase und folgende Dehydrogenase des TOL Plasmides zum korrespondierenden Chlorbrenzkatechin metabolisiert wird.
3. Für den Abbau von 4-Chlorbrenzkatechin sind ebenfalls die Enzyme des Chlorbrenzkatechin Abbauweges nötig.

Als Ausgangsorganismen zur Konstruktion eines Stammes zum Abbau von Chlortoluolen bieten sich Organismen an, welche schon von Natur aus einige dieser Sequenzen, so wie oben beschrieben, mit sich bringen. Ebenso können Sequenzen dieser und anderer Stämme als Hilfsmittel verwendet werden, um beliebige Ausgangsorganismen mit vollständigen Abbausequenzen auszustatten.

Die beiden Stämme *Pseudomonas putida* F1 sowie *Burkholderia* sp. PS12 wurden als mögliche Rezipientenstämme ausgewählt, da sie, wie oben beschrieben, eine relevante Aktivität mit 2-Chlortoluol sowie mit 3- und 4-Chlortoluol als Substrat aufweisen (Lehning et al., 1997).

Burkholderia sp. PS12 ist aufgrund der breiten Substratspezifität der Tetrachlorbenzol Dioxygenase interessant, welche neben einer Monooxygenierung von 2- und 3-Chlortoluol, 4-Chlortoluol und eine Vielzahl chlorierter Benzole am aromatischen Ring unter Bildung von Dihydrodiol dioxygeniert. Intermediäre chloresubstituierte Brenzkatechine werden wahrscheinlich über Enzyme des modifizierten *ortho*-Weges abgebaut.

Pseudomonas putida F1 enthält eine Toluol 2,3-Dioxygenase, die 2- und 3-Chlortoluol monooxygeniert und den aromatischen Ring des 4-Chlortoluols unter Bildung eines Dihydrodiols dioxygeniert. Das im letzten Fall gebildete 3-Chlor-6-methylbrenzkatechin wird durch diesen Stamm nicht weiter umgesetzt.

Die weiteren nötigen Sequenzen zur Komplettierung der Rezipientenstämme, entstammen den Stämmen *Pseudomonas putida* mt-2 (Murray et al., 1972), *Pseudomonas* sp. P51 (van der Meer et al., 1987) und *Pseudomonas cepacia* 2CBS (Fetzner et al., 1989).

Pseudomonas putida mt-2 enthält das Plasmid pWW0, welches auch als TOL-Plasmid bezeichnet wird. Genetische Studien zeigten, daß die Gene für die katabolischen Enzyme dieses Plasmides in zwei Operons organisiert sind, dem oberen und dem *meta*-Operon (Harayama et al., 1984; Harayama et al., 1986). Das obere Operon, welches im Rahmen dieser Arbeit interessant ist, kodiert für die Enzyme Xylol Oxygenase (XylAM), Benzylalkohol Dehydrogenase (XylB) und Benzaldehyd Dehydrogenase (XylC) (Worsey und Williams, 1975; Harayama et al., 1989). Die Gene stehen einschließlich des Gens *xyiN* unter der Kontrolle des Promotors Pu und werden durch das Regulatorprotein XylR aktiviert (Abril et al., 1989). Die Xylol Oxygenase kann die Monooxygenierung des 3- und 4-Chlortoluols, aber nicht des 2-Chlortoluols zum Chlorbenzylalkohol katalysieren.

Dieses Operon wird im Rahmen dieser Arbeit für die Oxidation der Chlorbenzylalkohole zu den entsprechenden Chlorbenzoesäuren, d. h. die Benzylalkohol und Benzaldehyd Dehydrogenase benötigt.

Pseudomonas sp. P51 ist zum Abbau chlorierter Substanzen wie z. B. 1,2- und 1,4-Dichlorbenzol und 1,2,4-Trichlorbenzol befähigt. Die zwei für den Abbau dieser Substanzen notwendige Gencluster wurden auf dem katabolischen Plasmid pP51 lokalisiert. Das eine Cluster mit den Genen *tcbA* und

tcbB kodiert für Enzyme des oberen Abbauweges, i.e. Trichlorbenzol Dioxygenase (TcbA) und die 3,4,6-Trichlor-*cis*-1,2-dihydroxycyclohexa-3,5-dien Dehydrogenase (TcbB), das andere, welches für den unteren Abbauweg kodiert, besteht aus den Genen *tcbCDEF* unter der Kontrolle des Regulators *tcbR*. Die Strukturgene kodieren für die Enzyme Chlorbrenzkatechin 1,2-Dioxygenase (TcbC), Chlormuconsäure Cycloisomerase (TcbD), Dienlacton Hydrolase (TcbE) und Maleylacetat Reduktase (TcbF) und werden im Rahmen dieser Arbeit für die Degradation von auftretenden Chlorbrenzkatechinen verwendet (van der Meer et al., 1991).

Der Stamm *Pseudomonas cepacia* 2CBS wurde als 2-Chlorbenzoat-Abbauer von Fetzner et al. (Fetzner et al., 1989) isoliert. Die für diese Arbeit entscheidenden Gene *cbdABC* wurden in einem Gencluster auf einem katabolischen Plasmid pBAH1 lokalisiert (Haak et al., 1995). Sie kodieren für die große (CbdA) und kleine (CbdB) Untereinheit der terminalen Oxygenase und für die NADH:Akzeptor Reduktase Komponente (CbdC) der 2-Halobenzoat 1,2-Dioxygenase und katalysieren die Oxidation von 2-Chlorbenzoat zum 2-Chlor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure, welches als instabiles Übergangsprodukt spontan Kohlendioxid und Chlorid unter Bildung von Brenzkatechin eliminiert (Fetzner et al., 1992).

1.13 Konstruktionsmethoden

Man kann Sequenzen, welche für Enzyme bestimmter Abbauwege kodieren, in Form von konjugativen Plasmiden in Rezipientenstämme transferieren. In der Tat sind die meisten der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Abbausequenzen auf Plasmiden kodiert, und neuartige Abbauwege könnten durch Kombination verschiedener Plasmide in einem Rezipientenstamm gewonnen werden. Jedoch ist das Einbringen mehrerer verschiedener Sequenzen und damit verschiedener Plasmide in einen Stamm häufig nur unter Schwierigkeiten möglich. Als Beispiel hierfür konnte eine Expression von Enzymen des TOL Plasmides im Stamm *Burkholderia* sp. PS12 nicht erreicht werden. Dieses Phänomen kann grundsätzlich in einem engen Wirtsspektrum eines Plasmides oder auf Inkompatibilität des Plasmides mit schon im Wirt vorhandenen Plasmiden begründet sein. Nur Plasmide unterschiedlicher Inkompatibilitätsgruppen können in einem Stamm koexistieren. Zu dem sind Plasmide häufig, wenn nicht speziell für sie selektioniert wird, instabil.

Natürlich könnten sämtliche für eine Konstruktion notwendigen Abbauwege auf einem synthetischen „Superplasmid“ vereinigt werden. Dieses bietet jedoch gegenüber den in dieser Arbeit verwendeten Minitransposonkassetten keine Vorteile. Neben der oben erwähnten Instabilität wären solche „engineerten“ Plasmide mehr oder weniger frei übertragbar, eine Eigenschaft, die aus Gründen der biologischen Sicherheit nicht erwünscht ist.

Anstelle von Plasmiden als Vektoren wurde deshalb die Klonierung mittels Transposons entwickelt. Die verwendeten Vektoren enthalten innerhalb der Insertionssequenzen („inverted repeats“) zusätzlich zum für die Transposase kodierenden Gen ein Selektionsmarkergen und die zu

übertragenden Gene. Aufgrund des verwendeten Replikationsursprung R6Kori, welcher abhängig vom π -Protein ist, können diese Vektoren in Rezipientenstämmen, denen der *pir*-Lokus für die Produktion des π -Proteins fehlt, nicht replizieren. Nach Transfer des Vektors exprimieren folglich nur solche Rezipienten, bei denen eine Transposition in das Chromosom stattgefunden hat, die innerhalb des Transposons lokalisierten Gene.

Somit kommt es zur stabilen Integration gewünschter Sequenzen in einen Ausgangsstamm ohne Replikation des Transferplasmides. Da eine Integration weiterer Transposons durch dieses integrierte Transposon blockiert ist, entwickelten de Lorenzo et al. die sogenannten Minitransposons, bei denen die Transposase außerhalb der Insertionssequenzen („inverted repeats“) lokalisiert ist und somit bei der Transposition verloren geht (de Lorenzo und Timmis, 1994). Diese Klonierungsvehikel erlauben die Integration mehrerer gewünschter Sequenzen in das Chromosom.

In der vorliegenden Arbeit wird die Konstruktion von Stämmen beschrieben, welche zum Abbau der monochlorierten Toluole befähigt sein sollen. Weiterhin werden die biochemischen Eigenschaften der verschiedenen Konstrukte sowie deren Vorstufen analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Autoklaven	Tecnomara AG
Brutschränke	Heraeus
Bunsenbrenner	Fireboy, Tecnomara
Chemostat	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Computer	IBM, Macintosh
Computerprogramme	Word, Endnote Plus, Mac Plasmag, Chemistry 4-D Draw, Canvas, Power Point
Drucker	HP LaserJet 4/4 M Plus PS, Hewlett Packard Apple Laser Writer 16/600 PS
Elektrophoresekammer	Horizon 58 und 5320, Bethesda Research Laboratories
Feinwaage	PM460 und AE260, Mettler
Filme	X-OMAT, Kodak
French-Press-Zelle	Aminco, American Instruments Company
HPLC	LC 10A, Shimadzu Corporation SIL 10A, Shimadzu Corporation CBM 10A, Shimadzu Corporation SPDM 10A, Shimadzu Corporation HP Deskjet 560C, Hewlett Packard DGU 3A, Shimadzu Corporation 7125, Rheodyne FCV 10AC, Shimadzu Corporation SC (Ø 4,6mm, Länge 125mm), gefüllt mit Lichrospher 100 RP8 Ø 5µm, Bishoff
Autosampler	
Data Processing Unit	
Dioden-Array Detector	
Drucker	
Entgaser	
Injektor	
Pumpe	
Säule	
Systemsteuerung	Personal Computer Prolinea 4/86
Hybridisierungssofen	Amersham
Kühlzentrifuge	RC5C, Sorvall Instruments, DuPont
Lichtmikroskop	Zeiss
Magnetrührer	M24/1, Framo-Gerätetechnik
Mikrowellenofen	Brother Powerwave
pH-Meter	CG804, Schott
Photoimager	Gel Video-System, Enhanced Analysis System E.A.S.Y. 429K, Herolab Molekulare Trenntechnik
Pipetten	Pipetus-akku, Hirschmann Laborgeräte Pipetman, Gilson

Röntgenfilmentwicklungsmaschine	INTAS PROTEC M45
Rotationsschüttler	G-53, EDISON, New Brunswick Scientific Corporation
	HT Infors AG
	SM25, Edmund Bühler
Sauerstoffelektrode	Hansatech LTD
Kontrollbox	CB1D, Hansatech
Wasserbad	DL, Haake
Wasserbad-Steuerung	D1, Haake
Schreiber	Se 120, Bachhofer
Southern-Blot-Apparatur	Pharmacia
Spannungsgeräte	Gene Power Supply GPS 200/400, Pharmacia
	ST 504 Gibco BRL
Spektrophotometer	DU-70, Beckman Instruments Inc.
	UV 2100, Shimadzu Corporation
Sterilbank	LaminAir HLB 2472, Heraeus
Thermocycler	Landgraf
Tischinkubator	Thermostat 5320, Eppendorf
Tischzentrifuge	Biofuge A Heraeus Sepatech
	Zentrifuge 5415 C, Eppendorf
Ultrazentrifuge	TL-100, Beckman Instruments Inc.
Vakuum Blotter	VacuGene XL, Pharmacia
Vakuum Zentrifuge (Speed Vac)	Savant DNA Speed VAc DNA A110
Vortex	VF2, Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik
Wasserreinigungssystem	Milli-Q, Millipore
Wasserbad	Köttermann-Labortechnik

2.2 Chemikalien

Wenn nicht anders beschrieben, wurden handelsübliche Chemikalien der Reinheit "zur Analyse" verwendet von den Firmen Acros, Aldrich Chemie, Boehringer Mannheim, Difco, Fluka, Gibco, J.T. Baker B.V., Merck, Oxoid, Riedel deHaen, Roth, Serva und Sigma.

Enzyme wurden von Boehringer Mannheim, Pharmacia, Stratagene, USB oder New England Biolabs bezogen.

2.3 Organismen

Tabelle 1: *Escherichia coli* K12 Stämme

Stamm	Referenz
CC118 λ pir	(Herrero et al., 1990)
DH5 α	(Hanahan, 1983)
HB101	(Boyer und Roulland-Dussoix, 1969)
S17-1	(Simon et al., 1983)

Tabelle 2: Andere Bakterienstämme

Stamm	relevante Eigenschaften	Referenz
<i>Burkholderia</i> sp. PS12		(Sander et al., 1991)
<i>Burkholderia</i> sp. PS12*	PS12 mit Insert aus pCK05	diese Arbeit
<i>Burkholderia</i> sp. PS12* + pKT231cbd	PS12* mit Plasmid pKT231cbd	diese Arbeit
<i>Burkholderia</i> sp. PS12 Δ	PS12 mit Insert aus pCK05 ohne Km ^r ohne <i>xylE</i>	diese Arbeit
<i>Burkholderia</i> sp. PS12 Δ + pKT231cbd	PS12 Δ mit Plasmid pKT231cbd	diese Arbeit
<i>Burkholderia</i> sp. PS12AL	PS12 Δ mit Insert aus pAL1	diese Arbeit
<i>Pseudomonas putida</i> F1		(Gibson et al., 1968)
<i>Pseudomonas putida</i> F1*	F1 mit Insert aus pCK05	diese Arbeit
<i>Pseudomonas putida</i> F1 Δ	F1 mit Insert aus pCK05 ohne Km ^r ohne <i>xylE</i>	diese Arbeit
<i>Pseudomonas putida</i> F1 Δ CC	F1 Δ mit Insert aus pBJ4/4	diese Arbeit
<i>Pseudomonas putida</i> F1 Δ CC + pKT231cbd	F1 Δ CC mit Plasmid pKT231cbd	diese Arbeit
<i>Pseudomonas putida</i> F1AL	F1 Δ CC mit Insert aus pAL1	diese Arbeit
<i>Pseudomonas putida</i> mt-2 DSM3931	mit Plasmid pWW0	(Murray et al., 1972)

Tabelle 3 : Plasmide/Vektoren

Bezeichnung	relevante Eigenschaften	Referenz
pAL1	Transposonvektor, Ap ^r , Km ^r , 2-Chlorbenzoat-Abbaugene	diese Arbeit
pBJ4/4	Transposonvektor, Ap ^r , Km ^r , Chlorbrenzkatechin-Abbaugene	Doktorarbeit (Jakobs, 1997)
pCK05	Transposonvektor, Ap ^r , Km ^r , Gene des oberen TOL- Abbauweges	Diplomarbeit (Panke, 1995) (Panke et al., 1998)
pJMSB8	Resolvase	(Kristensen et al., 1995)
pKT231 + 6kbEcoRI“cbdABC“ = pKT231cbd	Km ^r , Sm ^r , 2-Chlorbenzoat-Abbaugene	(Haak et al., 1995)
pRK600	Helferplasmid, Cm ^r	(Kessler et al., 1992)
pSPM100	Transposonvektor, Ap ^r , Tel ^r , Gene des <i>meta</i> -Abbauweges des TOL Plasmides	Diplomarbeit (Panke, 1995)
pSTO4	todC1C2BA	Beil, pers. Mitteilung
pUC18Not	Klonierungsvektor, Ap ^r	(Herrero et al., 1990)
pUTminiTn5Km2	Transposonvektor, Km ^r	(de Lorenzo et al., 1990)

2.4 Nährmedien, Puffer und Lösungen

2.4.1 Vollmedien

LB-Medium (Luria-Bertani Medium) (Maniatis et al., 1989)

Bacto-Trypton 10g
Hefe-Extrakt 5g
NaCl 10g
add 1000ml pH 7,0

2 xYT-Medium (Maniatis et al., 1989)

Trypton 16 g
Hefe-Extrakt 10 g
NaCl 5 g
add 1000ml pH 7,0

2.4.2 Mineralsalzmedium

Komponenten des Mineralsalzmediums:

2 x Puffer (Phosphatpuffer)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ 14g KH_2PO_4 2g ad 1000ml MilliQ-H ₂ O pH 7,2
20 x Puffer	10 x konzentrierter 2 x Puffer
Spurenelementlösung (für 100 x Salze)	HCl (25%) 1,3ml ZnCl_2 70mg $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 100mg H_3BO_4 62mg $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 190mg $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 17mg $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 24mg $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 36mg ad 1000ml MilliQ-H ₂ O
100 x Salze	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 5g getrennt autoklavieren $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 20g $\text{Fe-ammonium-citrat}$ (28%Fe) 1g ad 900ml MilliQ-H ₂ O Spurenelementlösung 100ml steril zufiltrieren

Zusammensetzung des Mineralsalzmediums:

Flüssigmedium	99% (v/v)	2 x Puffer
	1% (v/v)	100 x Salze
	jeweilige Konzentration der Kohlenstoffquelle	

Festmedium	10% (v/v)	20 x Puffer
	1% (v/v)	100 x Salze
	1,5% (w/v)	purified agar
	(OXOID Limited, Basingstoke, Hampshire, England)	
	jeweilige Konzentration der Kohlenstoffquelle	
	in MilliQ-H ₂ O	

2.4.3 Kohlenstoffquellen

Kohlenstoffquellen wurden den sterilen Medien aus sterilen konzentrierten Stammlösungen bis zu einer Endkonzentration von 5mM zugesetzt.

Hydrophobe Substanzen wurden für die Herstellung der Stammlösungen in HMN (Heptamethylnonan) bzw. DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Flüchtige, flüssige Kohlenstoffquellen wurden über die Gasphase zugeführt.

Im Falle des festen Mediums wurden die Kohlenstoffquellen zu einer Endkonzentration von 2mM direkt in den noch flüssigen, abgekühlten Agar gegeben bevor dieser in die Petrischalen gegossen wurde.

Flüchtige, flüssige Substanzen wurden in eine an der Spitze zugeschmolzenen Pipettenspitze gefüllt, und diese in den Deckel der Petrischale gelegt. Ebenso wurde mit den Feststoffen verfahren, die den Kunststoff des Petrischalendeckels angreifen würden. Nicht aggressive Feststoffe wurden einfach in den Petrischalendeckel gelegt.

2.4.4 Selektionsmarker und sonstige Medienzusätze

Antibiotika bzw. Schwermetalle wurden als sterilfiltrierte Stammlösungen bei -20°C aufbewahrt. Sie wurden dem Festmedium nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50°C in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Antibiotika:

Ampicillin (Ap)	1000 x Stammlösung	100 mg/ml in MilliQ-H ₂ O
	Endkonzentration	100 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	1000 x Stammlösung	30 mg/ml in Ethanol
	Endkonzentration	30 µg/ml
Kanamycin (Km)	1000 x Stammlösung	50 mg/ml in MilliQ- H ₂ O
	Endkonzentration	50 µg/ml

Piperacillin (Pip)	1000 x Stammlösung	100 mg/ml in MilliQ- H ₂ O
	Endkonzentration	100 µg/ml
Rifampicin (Rf)	1000 x Stammlösung	50 mg/ml in DMSO
	Endkonzentration	50 µg/ml
Streptomycin (Sm)	1000 x Stammlösung	100 mg/ml in MilliQ- H ₂ O
	Endkonzentration	100 µg/ml Stammlösung
Tetracylin (Tec)	1000 x Stammlösung	5 mg/ml in MilliQ- H ₂ O oder Ethanol
	Endkonzentration	5 µg/ml Stammlösung
Schwermetall:		
Kaliumtellurit (Tel)	1000 x Stammlösung	40 mg/ml in MilliQ- H ₂ O
	Endkonzentration	40 µg/ml
Xgal-Stammlösung	20mg/ml in Dimethylformamid	
	Lagerung bei -20°C	
	Zusatz pro Medienplatte 50µl	
IPTG	Stammlösung	10mM
	Endkonzentration	1mM

2.4.5 Sonstige Puffer und Lösungen

TE	10mM Tris-HCl 1mM EDTA pH 8
50x TAE	2M Trisbase 50 mM EDTA 57,1 ml/l Eisessig
Lysislösung	0,2M NaOH 1% SDS immer frisch angesetzt
Salzpuffer	3M Kaliumacetat 5M Eisessig pH 5,0

Probenpuffer	0,3% v/v Bromphenolblau 0,3% v/v Xylolcyanol 60% v/v Glyzerin in Wasser
20x SSC	0,3M NaCitrat 3M NaCl

2.5 Stammhaltung, Zellanzucht und Zellernte

2.5.1 Stammhaltung

Die Kulturen wurden bei 30°C bzw. *E. coli* bei 37°C angezogen und bei 4°C, Dunkelheit und Raumtemperatur gelagert. Weiterhin wurden zur Langzeitlagerung die Zellen bei -70°C in Mineralmedium mit 25% sterilem Glyzerin eingefroren. Zur Reinheitskontrolle wurden die Organismen auf LB-Medium ausgestrichen und die Einheitlichkeit der Kolonien überprüft.

2.5.2 Zellanzucht

Die Anzucht der Zellen erfolgte in Flüssigmedium. Dazu wurden Reagenzgläser oder Erlenmeyerkolben mit einem Nennvolumen von 100-3000ml verwendet und mit jeweils 10%-20% ihres Nennvolumens mit Medium gefüllt. Das Inokulum variierte je nach Bedarf von 0,005% - 10%. Die Inkubation erfolgte auf einem Rotationsschüttler bei 150rpm und 30°C bzw. 37°C.

Die Wachstumssubstrate wurden in Konzentrationen von 2 bis 5mM aus Stammlösungen (100 bis 500mM) dem Medium zugefügt.

Flüchtige Substrate wurden in entsprechender Menge über die Gasphase zugeführt. Hierbei wurde das Substrat in den Boden eines Glasröhrchens mit zwei gegenüberliegenden Bohrungen in 3cm Höhe gefüllt. Dieses ansonsten geschlossene Glasröhrchen steckte in einer Bohrung im gasdichten Schraubdeckel des Erlenmeyerkolbens.

2.5.3 Zellernte

Zur Zellernte wurden die Kulturen in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 10.000rpm für 10min (Rotor GSA) bzw. bei größeren Volumina mit 9.000rpm für 15min (Rotor GS-3) abzentrifugiert.

Das Zellpellet wurde anschließend mit Phosphatpuffer gewaschen, erneut abzentrifugiert und die Zellen mit Phosphatpuffer resuspendiert.

2.6 Kontinuierliche Kultivierung im Fermenter

Zur Aufrechterhaltung konstanter Wachstumsbedingungen erfolgte die Anzucht der Bakterien im Chemostaten. Die Organismen wurden in einem Sonderkulturgefäß für 1,0l Arbeitsvolumen kultiviert, welches einen Doppelmantel sowie eine Edelstahl-Deckelplatte mit verschiedenen Stutzen und Bohrungen besitzt.

Zum Kulturgefäß gehören ein Antriebsmotor für den Rotor, sowie ein Temperaturfühler, ein Begasungsrohr, eine Abluftkühleinheit, ein Ernterohr, eine pH-Elektrode, eine Niveausonde und vier Stutzen zur Zuführung verschiedener Medien.

Die komplette Fermentationseinheit besteht weiterhin aus einem Thermomix, welcher die Manteltemperatur regelt, einer Gasmischeinheit, diversen Pumpen und einer DCU-Steuereinheit.

Zu Beginn der Fermentation wurde das Kulturgefäß mit einem Liter Medium befüllt, autoklaviert und über den Impfstutzen beimpft. Steriles Medium wurde aus einem Vorratsgefäß mit einer Pumpe kontinuierlich in das Kulturgefäß gepumpt, die Kulturbrühe entsprechend kontinuierlich mit Hilfe einer Pumpe abgeführt. Sterile angefeuchtete Luft wurde, gesteuert über die Gasmischeinheit, in das Gefäß eingeblasen. Ein Teilstrom der Zuluft wurde durch eine Waschflasche mit flüssigem Chlorbenzol/-toluol geleitet. Die durch das flüchtige Substrat gesättigte Luft wurde mit dem Hauptluftstrom vereinigt und in den Fermenter eingeblasen. Die Teilströme der Luft wurden über die Gasmischeinheit reguliert und photometrisch mittels einer 10cm Quarz-Durchflußküvette im Lichtstrahl bei einer Wellenlänge von 210nm quantifiziert. Durch das Rührwerk im Kulturgefäß wurde die einströmende Luft in kleine Bläschen zerschlagen, was eine gute Belüftung zur Folge hatte. Die Fermentationen wurden bei 30°C, 300rpm, pH7,2 und einer Durchflußgeschwindigkeit von 15ml/h durchgeführt.

2.7 Wachstumsmessung

Das Wachstum wurde durch Messung der Trübung verfolgt. Hierzu wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 546\text{nm}$ und einer Schichtdicke von 1cm mit einem Spektrophotometer gemessen.

Zum Nullabgleich diente Phosphatpuffer, ebenso zur Verdünnung der Proben, wenn die optische Dichte einen Wert von 0,3 überstieg.

2.8 Messung der Sauerstoffaufnahme

Durch die Messung der Sauerstoffaufnahme ist feststellbar, ob ein Substrat von einem Organismus angegriffen wird. Die gegenüber der Grundaktivität erhöhte Sauerstoffaufnahme beruht auf der Aktivität der initialen Dioxygenase bzw. weiterer in den Abbau involvierter Oxygenasen. Die Messung der Sauerstoffaufnahme kann auch als Verfahren zur Bestimmung von Enzymaktivitäten dienen.

Messungen des Sauerstoffverbrauches wurden polarographisch mit einer Sauerstoffelektrodeneinheit bei 25°C durchgeführt und aufgezeichnet.

Die Eichung der Elektrode erfolgte über die Einstellung des Maximalwertes mit sauerstoffgesättigtem Phosphatpuffer und des Nullwertes nach Zugabe einiger Kristalle des Reduktionsmittels Natriumdithionit.

Bei 25°C beträgt die maximale Sauerstoffkonzentration im Phosphatpuffer 0,25 $\mu\text{mol O}_2/\text{ml}$.

Die Messungen wurden mit ganzen Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Substraten kultiviert, in der spätexponentiellen Phase geerntet, gewaschen, in 1ml Phosphatpuffer resuspendiert und die optische Dichte dieser Suspension bestimmt.

In der Meßzelle der Sauerstoffelektrode (Volumen 1ml) wurde die Zellsuspension mit Hilfe von Phosphatpuffer (50mM, pH 7,4) auf eine optische Dichte von 1,0 eingestellt. Das eingefüllte Volumen betrug 990 μl . Nach Verschluss der Meßkammer wurde die endogene Atmung aufgezeichnet.

Anschließend wurden 10 μl einer 100mM Substratstammlösung (gelöst in MilliQ- H_2O , DMSO oder HMN) zugegeben und die spezifische Sauerstoffaufnahme für das jeweilige Substrat gemessen.

Alle Substrate wurden in einer Konzentration von 0,3mM im Reaktionsansatz eingesetzt.

Die erhaltenen Meßwerte wurden jeweils um den Betrag der endogenen Atmung korrigiert.

2.9 Herstellung von Protein-Rohextrakten

Zellen wurden in der spätexponentiellen Phase geerntet und gewaschen. Das erhaltene Zellpellet wurde in 1ml 100mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 resuspendiert und in einer vorgekühlten French-Press-Zelle bei einem Druck von 90 kp/cm^2 aufgeschlossen. Zur Entfernung von Zelltrümmern und ganzen Zellen wurde der Extrakt bei 4°C und 30000rpm in einer Ultrazentrifuge für 30min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und für Proteinbestimmungen und Enzymaktivitätsmessungen verwendet.

2.10 Bestimmung von Proteingehalten

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte leicht modifiziert nach der Methode von BRADFORD (Bradford, 1976) mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standardprotein. Wenn nicht anders beschrieben, so wurde jede Messung in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die zu bestimmende Proteinlösung wurde mit MilliQ-H₂O auf ein Volumen von 800µl verdünnt. Dann wurden 200µl Bradford-Reagenz (Fa. BioRad, Richmond, USA) zugesetzt und durchmischt. Nach 5min Reaktionszeit bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Extinktion dieser Lösung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595\text{nm}$ im Spektrophotometer. Das Ergebnis wurde um den Blindwert (800µl H₂O + 200µl Bradford-Reagenz) korrigiert.

Der Proteingehalt wurde aus den Extinktionsmeßwerten durch Berechnung mit der Geradengleichung einer Kalibriergerade ermittelt. Die Kalibriergerade wurde aus den Meßwerten einer seriellen Verdünnung der BSA-Stammlösung mittels linearer Regression ermittelt.

Diese Kalibriergerade wurde einmal für das verwendete Bradford-Reagenz ermittelt und für alle Proteinbestimmungen angewendet.

2.11 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Eine Enzymeinheit [1unit = 1U] entspricht der Enzymaktivität, die den Umsatz von 1µmol Substrat/min, bzw. die Bildung von 1µmol Produkt/min bei 25°C katalysiert. Die spezifische Aktivität wird, bezogen auf den Proteingehalt, in Units/Gramm Protein [U/g] angegeben.

Alle Enzymaktivitäten wurden durch photometrische Messung bestimmt. Die Aktivitätsbestimmungen der Protein-Rohextrakte erfolgten in einer thermostatisierten Kammer des Spektrophotometer UV 2100 der Fa. Shimadzu.

Alle Enzymtests wurden durch Substratzugabe gestartet.

2.11.1 Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase (E.C.1.13.11.1)

= Catechol: oxygen 1,2-oxidoreductase (decycling)

Brenzkatechin (= Catechol) wird durch die Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase zu *cis,cis*-Muconsäure umgesetzt. Im Enzymtest wurde die Produktbildung bei $\lambda = 260\text{nm}$ gemessen.

Der molare Extinktionskoeffizient von *cis,cis*-Muconsäure beträgt nach DORN und KNACKMUS (Dorn und Knackmuss, 1978a) bei dieser Wellenlänge $\epsilon = 16800 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Modifiziert nach HEGEMAN (Hegemann, 1966) enthielten die Reaktionsansätze in 1ml:

33,0 μ mol	Tris/HCl-Puffer, pH 8,0
1,3 μ mol	EDTA
0,5 μ mol	Brenzkatechin, 3-Methylbrenzkatechin oder 3-Chlorbrenzkatechin
2-20 μ l	Rohextrakt

Bei Vorhandensein von Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase wurde der Testansatz vor der Messung 10min mit 30 μ l 0,3%iger H₂O₂-Lösung zur Inaktivierung dieses Enzyms inkubiert (Nakazawa und Yokota, 1973).

2.11.2 Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase (E.C.1.13.11.2)

= Catechol: oxygen 2,3-oxidoreductase (decycling)

Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von Brenzkatechin zu 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd.

Die Produktbildung als Maß für die Enzymaktivität wurde bei $\lambda = 375\text{nm}$ gemessen (Sala-Trepat und Evans, 1971). Der molare Extinktionskoeffizient für 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd beträgt: $\epsilon = 67800 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Wallis und Chapman, 1990).

Zur Bestimmung der Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase-Aktivität enthielten die Testansätze verändert nach NOZAKI (Nozaki, 1973) in 1ml:

50 μ mol	Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ -Puffer, pH 8,0
1 μ mol	Brenzkatechin
2-20 μ l	Rohextrakt

2.11.3 *cis*-3,5-Cyclohexadien-1,2-diol Dehydrogenase (Benzoldihydrodiol Dehydrogenase)

Der Test beruht auf der Reduktion des Cosubstrates NAD⁺ und der dabei photometrisch verfolgten Bildung von NADH, dessen Absorptionsmaximum bei $\lambda = 340\text{nm}$ liegt. Der molare Extinktionskoeffizient für NADH beträgt: $\epsilon = 6220 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Shaw und Harayama, 1990).

Der von Schraa et al. (Schraa et al., 1986) beschriebene Test wurde hinsichtlich des Puffers abgewandelt.

Zusammensetzung in 1ml Reaktionsansatz:

33mmol	Tris/HCl-Puffer pH 8,0
0,66mmol	NAD ⁺
0,34mmol	<i>cis</i> -3,5-Cyclohexadien-1,2-diol
10-50µl	Rohextrakt

2.11.4 Dienlacton Hydrolase (E.C.3.1.1.45) (4-Carboxymethylenbut-2-en-4-olid Hydrolase)

Die Aktivität der Dienlacton Hydrolase wurde durch die Extinktionsabnahme bei $\lambda = 280\text{nm}$, bedingt durch die Abnahme des Substrates *cis*-Dienlacton ($\epsilon = 15625 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), photometrisch gemessen. In 1ml Reaktionsansatz waren enthalten (Schlömman, 1982):

10mmol	Histidin/HCl-Puffer pH 6,5
0,1mmol	<i>cis</i> -Dienlacton
2-50µl	Rohextrakt

2.11.5 2-Chlorbenzoat-Dioxygenase

Die Aktivität der 2-Chlorbenzoat-Dioxygenase wurde als NADH-Verbrauch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340\text{nm}$ gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient für NADH beträgt:
 $\epsilon = 6220 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Shaw und Harayama, 1990).

Die Reaktionsansätze enthielten nach FETZNER et al. (Fetzner et al., 1992) in 1ml:

50mM	Succinat-Puffer, pH 6,5
0,14mM	$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$
0,2mM	NADH
2µM	FAD
0,2mM	2-Chlorbenzoat
2-20µl	Rohextrakt

2.11.6 Benzylalkohol-Dehydrogenase

Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von Benzylalkohol zu Benzaldehyd unter Reduktion von NAD^+ zu NADH. Die Produktion von NADH als Maß für die Enzymaktivität wurde bei $\lambda = 340\text{nm}$ gemessen (Shaw und Harayama, 1990).

Der molare Extinktionskoeffizient für NADH beträgt: $\epsilon = 6220 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Shaw und Harayama, 1990).

Zur Bestimmung der Benzylalkohol-Dehydrogenase-Aktivität enthielten die Testansätze verändert nach SHAW (Shaw und Harayama, 1990) in 1ml:

100 μmol	Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,4
40 μmol	Benzylalkohol
1 μmol	NAD^+
2-20 μl	Rohextrakt

200mM Hydrazin wurden 10min vor der Messung zugegeben, um eventuell vorhandenes Benzaldehyd zu beseitigen, welches durch die folgende Benzaldehyd-Dehydrogenase unter Bildung von NADH oxidiert würde (Shaw und Harayama, 1990).

2.11.7 Benzaldehyd-Dehydrogenase

Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von Benzaldehyd zu Benzoesäure unter Reduktion von NAD^+ zu NADH. Die Produktion von NADH als Maß für die Enzymaktivität wurde bei $\lambda = 340\text{nm}$ gemessen (Shaw und Harayama, 1990).

Der molare Extinktionskoeffizient für NADH beträgt: $\epsilon = 6220 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Shaw und Harayama, 1990).

Zur Bestimmung der Benzaldehyd-Dehydrogenase-Aktivität enthielten die Testansätze verändert nach INOUE (Inoue et al., 1995) in 1ml:

100 μmol	Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,2
40 μmol	Benzaldehyd
1 μmol	NAD^+
2-20 μl	Rohextrakt

2.12 Durchführung von Substratumsätzen

Die Zellen wurden mit den entsprechenden Substraten angezogen und geerntet. Das Zellpellet wurde in Phosphatpuffer aufgenommen und auf eine OD_{600nm} von 5,0 bzw. 10,0 eingestellt. Umsätze wurden in Volumina von 10ml durchgeführt. Das entsprechende umzusetzende Substrat wurde in einer Konzentration von 0,3mM zugefügt.

Der Umsatz erfolgte über einen Zeitraum von bis zu 4 Stunden. Zur Messung des Substratverbrauchs und der Produktbildung wurden während des Umsatzes Fraktionen von 500µl Zellsuspension entnommen, für 5min bei 10.000rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge) und im Überstand die Substratabnahme (im Fall von wasserlöslichen Substraten) sowie die mögliche Entstehung von Zwischen- und Endprodukten überprüft, indem jeweils 10µl mittels analytischer HPLC analysiert wurden.

Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit einiger Substrate war eine direkte Bestimmung der Substratabnahme in den Kulturen nicht möglich. Zur Quantifizierung des Substratumsatzes wurden zwei Kulturen mit Substrat versetzt. Zur Verifizierung der Anfangskonzentration wurde eine Kultur sofort mit dem gleichen Volumen Dichlormethan versetzt, die zweite zur Bestimmung der Endkonzentration nach 4h. Nach 5-minütigem Schütteln wurden 10µl der Dichlormethanphase mittels HPLC analysiert.

2.13 Durchführung von Induktionsversuchen

Induktionsversuche wurden in einem Volumen von 10ml Zellsuspension mit einer OD_{600nm} von 1,0 durchgeführt. Zusätzlich wurden die Kolben mit 100µl 100x Salzen versetzt. Die Substrat-Zugabe betrug 0,3mM oder 2,5mM. Analog zu den Substratumsätzen wurde in einem Zeitrahmen von null bis sechs Stunden die Substrat-, Zwischen- oder Endproduktkonzentrationen mittels Zentrifugation und anschließender Analyse mittels HPLC bestimmt.

2.14 Chromatographische und spektroskopische Methoden

Substanzen wurden mittels HPLC/UV/VIS charakterisiert. Die Identifizierung durch HPLC erforderte das Vorhandensein von Referenzsubstanzen. Durch den Vergleich der Retentionszeiten und UV-Spektren konnte die Bestimmung erfolgen.

2.14.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Dieses Verfahren diente zur Auftrennung, Identifizierung und Quantifizierung der Substrate und Metabolite.

Es wurde die "reversed phase"-Adsorptionschromatographie verwendet, bei der das Laufmittel polarer ist als die stationäre Phase. Als Laufmittel diente Methanol der höchsten Reinheitsstufe ("HPLC-Grade" der Firma Baker) in wäßriger Lösung. Die Eluenten wurden durch den Zusatz von 1‰ H_3PO_4 (v/v) angesäuert, um vorhandene Carboxylgruppen zu protonieren, und so alle Verbindungen in einheitlicher undissoziierter Form zu erhalten.

2.14.1.1 Analytische HPLC

Mit Hilfe der analytischen HPLC wurden Substanzen qualitativ und quantitativ bestimmt.

Es wurde isokratisch mit entsprechenden Prozentanteilen (v/v) Methanol bei einer Flußrate von 1ml/min eluiert. Das Fließmittel wurde, durch die Pumpe gesteuert, aus MilliQ-Wasser mit 1‰ H_3PO_4 und 90%igem Methanol mit 1‰ H_3PO_4 gemischt. Beide Eluenten wurden direkt vor der Benutzung unter Wasserstrahlpumpen-Vakuum sterilfiltriert (\varnothing 0,45µm) und dabei gleichzeitig entgast. In der Regel wurden 10µl Probe manuell injiziert. Die Auswertung erfolgte über die Signalfächen durch automatische Integration der ermittelten Signale sowie über Retentionsvolumen (Retentionszeit) und UV-Spektrum.

Mit dem HPLC-Verfahren können unter Zuhilfenahme entsprechender Standards Konzentrationen von Produktmischungen berechnet werden, sowie einwandfreie Identifizierungen von Substanzen über Retentionsvolumina und UV-Spektren erfolgen.

2.15 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente zur Größenbestimmung von Plasmiden und DNA-Fragmenten sowie zur Qualitätskontrolle der präparierten DNA. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0,4% (w/v) (genomische DNA) und 2,0% (w/v) (<600bp) verwendet. Die entsprechende Agarosemenge wurde in 1x TAE Puffer eingewogen und aufgekocht und in flüssigem Zustand in eine Elektrophoresekammer gegossen. Die DNA Proben sowie Standards wurden mit 0,1Vol Probenlösung (60% Glycerin, 0,3% Xylolcyanol, 0,3% Bromphenolblau(v/v)) versehen, damit das Gel beladen, und die Elektrophorese mit 1x TAE Laufpuffer bei einer Spannung von 20-100V/cm durchgeführt.

Zum Anfärben der DNA wurde das Gel in ein Ethidiumbromid-Bad (1µg/ml) gelegt und 10min später im UV-Licht mit dem Photoimager (Gel Video-System) photographiert.

Als Molekulargewichtsmarker für DNA-Fragmente dienten entweder kommerziell erhältliche Molekulargewichtsmarker (Fa. Boehringer, Mannheim) oder λ -Phagen-DNA, die mit BstEII geschnitten wurde.

2.16 DNA-Präparation

2.16.1 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Für die Präparation (verändert nach (Maniatis et al., 1989)) wurden 50ml Bakteriensuspension abzentrifugiert (6000rpm, 10min), der Kulturüberstand dekantiert, und die Zellen in 5ml GTE-Puffer, welcher 10mg/ml Lysozym enthielt, resuspendiert. Nach Inkubation für 10min auf Eis wurden 10ml Lysislösung (NaOH/SDS) zugegeben, vorsichtig gemischt und erneut 10min auf Eis inkubiert. Die Zellwandbestandteile und Proteine der aufgebrochenen Bakterien wurden mit 7,5ml Salzpuffer (3M NaAc) für 10min auf Eis präzipitiert und das Präzipitat abzentrifugiert (14000rpm, 15min). Der flüssige, klare Überstand wurde durch ein Kleenextuch filtriert und die DNA anschließend mit 10ml 100% Isopropanol präzipitiert und zentrifugiert (14000rpm, 15min). Das DNA Pellet wurde an der Luft getrocknet, in 2ml 50mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 gelöst und mit 2ml 5M LiCl versetzt. Nach 15-30 minütiger Inkubation auf Eis wurden die ausgefallenen Bestandteile abzentrifugiert (6000rpm, 5min). Der Überstand wurde in einem neuen Röhrchen mit 10ml Ethanol versetzt und 1 Std. bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde abzentrifugiert (14000rpm, 10min), an der Luft getrocknet und in 400µl TE-Puffer mit 1µl 10mg/ml RNase resuspendiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurde eine Phenolextraktion durchgeführt (siehe DNA-Phenolreinigung 2.16.6.). Die getrocknete DNA wurde anschließend in 20µl TE resuspendiert.

2.16.2 Präparation von Plasmid-DNA mit Hilfe von Qiagen-Säulen

Bei dieser Methode der Plasmid-DNA Präparation wurden die Plasmide mit Hilfe einer Säulen-Chromatographie aufgereinigt. Alles für diese Präparation benötigte Material und die Puffer wurden von der Firma Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland) bezogen. Je nach Menge der zu reinigenden DNA wurden verschiedene Säulen verwendet. Bis zu 20µg Plasmid-DNA wurde mit einer Qiagen-tip 20 Säule, bis zu 100µg Plasmid-DNA mit einer Qiagen-tip 100 Säule und bis zu 500µg Plasmid-DNA mit einer Qiagen-tip 500 Säule gereinigt. Die Präparation erfolgte genau nach den Angaben aus dem Hersteller-Protokoll.

2.16.3 Präparation von Plasmid-DNA mit Qiagen-Spinprep

Die Aufreinigung von Plasmiden über QiagenSpinprep eignet sich zur schnellen Präparation von Plasmiden aus kleinen Kulturvolumina von 3-5ml und erfolgte nach den Angaben aus dem Herstellerprotokoll (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland).

2.16.4 Schnelligisolierung von Plasmid-DNA (Ish-Horowicz und Burke, 1981)

Der Überstand von 1,5ml Übernachtskultur wurde nach Zentrifugation (8000rpm, 2min, RT) vollständig entfernt und das Zellpellet in 100µl GTE resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 200µl Lysislösung versetzt und vorsichtig vermischt. Nach 5 minütiger Inkubation auf Eis wurden 150µl Salzpuffer dazugegeben, gut geschüttelt und für 5min auf Eis belassen. Nach anschließender Zentrifugation (14000rpm, 10min, RT) wurde der Überstand abpipettiert, mit 2Vol eiskaltem Ethanol versetzt, und nach Zentrifugation (14000rpm, 15min, RT) das Pellet mit 200µl 70% Ethanol zweimal gewaschen. Nach Trocknung wurde dieses in 20µl TE-Puffer aufgenommen.

2.16.5 Präparation genomischer DNA

Bei dieser Methode (Ausubel et al., 1994) wurden 1,5-5ml einer gut bewachsenen Kultur 2min bei 14000rpm pelletiert und der Überstand vollständig entfernt. Das Pellet wurde in 576µl TE vollständig resuspendiert, mit 30µl 10% SDS und 3µl Proteinase K (20mg/ml) vermischt und 1h bei 37°C inkubiert. Nach Mischen mit 100µl 5M NaCl und Zugabe von 80µl CTAB/NaCl (10% Hexadecyltrimethylammoniumbromid in 0,7M NaCl) wurde erneut 10min bei 65°C inkubiert. Durch Zufügen von 1Vol Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) und anschließender Zentrifugation (14000rpm, 5min, RT) wurde der DNA-haltige Überstand vom CTAB-Protein-Polysaccharid-Präzipitat getrennt, in ein neues Gefäß überführt, mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol TE-gesättigt (25:24:1) extrahiert und in 0,6Vol Isopropanol präzipitiert. Die DNA wurde an einer zugeschmolzenen Pasteurpipette gesammelt oder durch Zentrifugation gewonnen, mit 70%igem Ethanol gereinigt und in 100µl TE-Puffer aufgenommen.

2.16.6 DNA-Phenolreinigung

Die Phenolreinigung erfolgte modifiziert nach Maniatis (Maniatis et al., 1989).

In einem Eppendorfgefäß wurde 1Vol Tris-gesättigtes Phenol, pH 8,0 (RotiPhenol, Roth, Deutschland) mit 1Vol DNA-Lösung gut geschüttelt, die Phasen durch Zentrifugation (14000rpm,

5min) getrennt, und die obere, wäßrige Phase mit dem gleichen Volumen Phenol:Chloroform (1:1) nach der oben beschriebenen Methode extrahiert. Der Vorgang wurde mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) wiederholt und die wäßrige Phase anschließend zum Ausfällen der DNA mit 0,1Vol 3M Natriumacetatlösung pH 5,2 und 2,5Vol Ethanol für 30min bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation (14000rpm, 20min, 4°C) wurde das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und im Exsikkator getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen.

2.16.7 Aufreinigung von DNA durch Tropfendialyse

Um störende Salze aus der DNA-Suspension zu entfernen, wurde eine Tropfendialyse durchgeführt, dabei wurde gegen MilliQ-H₂O als Dialyse-Medium dialysiert, indem eine Membranfilterscheibe (Fa. Millipore; 0,025-0,05µm Porengröße auf die Wasseroberfläche gelegt und die Probe auf die Membran als Tröpfchen aufgetragen wurde. Nach 30min wurde die entsalzte Probe durch Abpipettieren wiedergewonnen.

2.17 Extraktion von DNA-Banden aus einem Agarosegel

Die gewünschte Bande wurde als möglichst kleines Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in einem Eppendorfgefäß gewogen und mit dem Qiaex II Agarose Gel Extraktionskit von Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) aufgearbeitet. Die so gewonnene DNA wurde erneut im Agarosegel getestet.

2.18 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration einer Lösung und deren Reinheitsgrad läßt sich photometrisch bestimmen, da DNA Licht bei 260nm absorbiert und verunreinigende Proteine bei 280nm.

Die DNA-Konzentration berechnet sich über folgende Formel:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] \cdot A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$$

Aus dem Koeffizienten A_{260}/A_{280} läßt sich die Reinheit der DNA-Lösung ermitteln. Der Koeffizient sollte bei ca. 1,8 liegen, da bei einem Wert $< 1,8$ die Kontamination durch Proteine und bei einem Wert $> 1,8$ die Kontamination durch RNA zu hoch ist.

2.19 Southern-Blot

Die Southern-Blot-Technik wurde dazu genutzt, um DNA-Fragmente von einem Agarosegel auf eine positivgeladene Nylonmembran zu transferieren.

Es wurden Restriktionsverdauungen von chromosomaler DNA und von Plasmid-DNA in einem Agarosegel aufgetrennt, einer Stratalinker-Reaktion unterzogen und anschliessend mit Hilfe eines Vakuum Blotters bei 50-60mbar auf eine positiv geladene Nylonmembran (PAL, USA) transferiert. Als DNA-Molekulargewichtsmarker wurden kommerziell erhältliche Digoxigenin-markierte Marker der Firma Boehringer Mannheim verwendet. Während des Transfers wurde 20min depurinisiert (0,2N HCl) und 20min denaturiert (1,5M NaCl, 0,5M NaOH), so daß die DNA als Einzelstrang auf der Membran vorlag. Nach Depurinierung, Denaturierung und 20min Neutralisierung (1M Tris, 2M NaCl) wurde für den Transfer für 1h 20x SSC als Transferlösung zugegeben. Die DNA wurde nach dem Transfer auf der Membran mit einem Stratalinker (Stratagene) fixiert.

2.20 Nicht-Radioaktive DNA-Hybridisierung

Die nicht radioaktive DNA-Hybridisierung dient dazu, Homologien zwischen verschiedenen DNA-Fragmenten zu untersuchen.

Als Sonden für die DNA-Hybridisierung wurden mit Digoxigenin markierte DNA-Fragmente eingesetzt. Dazu wurde das zu markierende Fragment mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen aus dem Plasmid herausgeschnitten und anschließend im Agarosegel isoliert und gereinigt. Die Markierung wurde mit einem DNA-Markierungs-Kit (Fa. Boehringer, Mannheim; # 1277 056) durchgeführt. Bei der Markierungsreaktion paaren unspezifische hexamere Primer mit dem zu markierenden DNA-Fragment, das zuvor denaturiert wurde (10min, 95°C). Die Klenow-DNA-Polymerase verlängert diese Primer. Anstelle von dTTP werden Digoxigenin markierte dUTP Nukleotide in die neu synthetisierte DNA eingebaut.

Die Hybridisierungsreaktion erfolgte mit einer Membran, die, wie unter 2.19 beschrieben, behandelt wurde. Die Hybridisierung der denaturierten Sonde erfolgte unter stringenten Bedingungen bei 42°C und 50% Formamid nach dem Protokoll der Firma Boehringer. Die anschließende Chemolumineszenz-Reaktion wurde mit einem Kit (Fa. Boehringer, Mannheim; # 1363514) durchgeführt.

2.21 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine einfache Methode, *in vitro* DNA-Fragmente zu amplifizieren. Zwei komplementäre Primer binden mit ihren 3'-Enden zueinander spezifisch an doppelsträngige hitzedenaturierte DNA

(„Template“). Durch die zyklische Aneinanderreihung verschiedener Temperaturschritte (Denaturierung 95°C, Hybridisierung / „Annealing“ x°C, Amplifikation 72°C) verlängert die Taq-Polymerase in Anwesenheit der vier verschiedenen Oligonukleotide die Zielregion.

Die Standard-PCR wurde in 25 bzw. 50µl durchgeführt, wobei folgende Konzentrationen der einzelnen Komponenten bei einem Reaktionsvolumen von 25µl eingesetzt wurden: 50ng „Template“, 10pM Primer, 10mM pro dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2,5µl 10x Taq-Polymerase-Puffer (500mM KCl, 100mM TrisHCl pH8, 3,25mM MgCl₂, 0,1%(w/v) Gelatine), 2,5u Taq-Polymerase (Fa. Boehringer Mannheim, # 11146173) add 25µl mit MilliQ-H₂O. Um Verdunstung zu verhindern, wurde das Reaktionsgemisch mit Öl überschichtet. Der eigentlichen PCR wurde ein zusätzlicher Denaturierungsschritt vorgeschaltet ("Hot start"), der dazu dient, die Template DNA mit hohem GC-Gehalt optimal zu denaturieren. Erst nach diesem Schritt wurde die Taq-Polymerase zugegeben. Die Produkte der PCR-Reaktion wurde mit einem Agarosegel analysiert.

2.22 Enzymatische Manipulationen von DNA

2.22.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische Sequenzen doppelsträngiger DNA erkennen und spalten können. Die Restriktionsenzyme der Klasse II spalten die DNA innerhalb ihrer 4 bis 8 Nukleotid langen Erkennungssequenz.

Die Volumina der Inkubationsansätze wurden so gering wie möglich gehalten. Je nach Konzentration der eingesetzten DNA betrug das Volumen 10 bis 100µl. Ungefähr 0,5-3µg DNA wurde mit sterilem MilliQ-H₂O und der entsprechenden Menge zehnfach konzentriertem kommerziell erhältlichen Restriktionspuffer (Boehringer, Biolabs, Pharmacia, Stratagene) der entsprechenden Restriktionsenzyme versetzt. Nach Zugabe von 1-5Units eines Restriktionsenzym wurden die Reaktionsansätze 2h, abhängig vom eingesetzten Enzym, meist bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Inkubation in Eis gestoppt oder die Restriktionsenzyme durch 10-minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert. Die Restriktionsfragmente konnten direkt im Agarosegel aufgetrennt werden. Genomische DNA wurde vor der Spaltung 20min dialysiert.

2.22.2 Abspaltung endständiger Phosphatgruppen von DNA

Mit nur einem Enzym gespaltene Vektor-DNA wurde mit alkalischer Phosphatase zur Abspaltung der 5'-terminalen Phosphate behandelt, um eine Religierung des Vektors zu verhindern. Die Verwendung dephosphorylierter Vektor-DNA erhöht die Ausbeute an Klonen mit erfolgtem Fragment-Einbau gegenüber religiertem Vektor deutlich.

Die Dephosphorylierung mit Hilfe der alkalischen Phosphatase aus arktischen Krabben (USB, Cleveland, Ohio, USA) bietet den Vorteil, daß das Enzym durch Inkubation bei 65°C für 15min inaktivierbar ist, und somit keine anschließende Phenolextraktion notwendig ist.

2,5µg DNA wurden in MilliQ-H₂O inklusive entsprechendem 10x SAP-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 0,1-0,5Units alkalischer Phosphatase je nach Art der durch das Restriktionsenzym entstandenen überhängenden Enden der DNA 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch 15-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert. Die DNA konnte ohne weitere Behandlung für die Ligation eingesetzt werden.

2.22.3 Ligation

Die T4-DNA-Ligase verknüpft doppelsträngige Restriktionsfragmente unter Verbrauch von ATP. Zu gespaltenen Vektor-DNA (ca. 20-60µg/ml), wenn notwendig, dephosphoryliert, wurde die ca. 5-10fache Menge Fragment-DNA (Insert) gegeben. Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 15µl, mit der entsprechenden Menge an 10x Ligations-Puffer (500mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM MgCl₂, 100mM DTT, 10mM Spermidin, 10mM ATP, 1mg/ml BSA oder T4-DNA-Ligase-Puffer und einer Enzymeinheit (1Unit) T4-DNA-Ligase. Der gesamte Ansatz wurde 2h bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert und konnte direkt für die Transformation verwendet werden.

2.23 Einschleusen von DNA in Empfängerorganismen

2.23.1 Transformation

200ml LB-Medium wurden mit 200µl einer Bakterien-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2-0,4 kultiviert. Nach Erreichen der gewünschten Dichte wurde das Wachstum in Eis gestoppt und alle weiteren Schritte mit vorgekühlten Lösungen und Gefäßen durchgeführt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (GS3-Rotor, 7000rpm, 5min, 4°C), sehr schonend in 40ml Puffer I für kompetente Zellen (10mM NaAcetat pH 5,6, 50mM MnCl₂, 5mM NaCl) aufgenommen und 20min in Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert (SS34-Rotor, 7000rpm, 5min, 4°C) und in 4ml Puffer II für kompetente Zellen (10mM NaAcetat pH 5,6, 5% Glycerin, 70mM CaCl₂, 5mM MnCl₂) vorsichtig resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden dann in 200µl Aliquots aufgeteilt und innerhalb einer Stunde zur Transformation verwendet oder bei -70°C aufbewahrt.

Für die Transformation wurden die bei -70°C gelagerten kompetenten Zellen langsam in Eis aufgetaut und anschließend mit 1-500ng Plasmid-DNA gemischt. Nach 1h Inkubation im Eis erfolgte ein dreiminütiger Hitzeschock bei 42°C. Damit die selektiven Markergene exprimiert werden konnten,

wurde vor dem Ausplattieren des Transformationsansatzes auf Selektionsmedien dieser in 3ml LB-Medium bei 37°C für 1-2h inkubiert.

2.23.2 Konjugation (biparental und triparental)

Zur Übertragung konjugativer (*tra+*, *mob+*) und mobilisierbarer (*mob+*) Plasmide von einer Bakterienzelle (Donor) in eine andere (Rezipient) wurden die Bakterien über Nacht in flüssigem Selektivmedium angezogen. Am nächsten Tag wurden je 100µl der Kulturen pelletiert, einmal mit 50mM MgSO₄-Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Mit 100µl der MgSO₄-Lösung wurde zunächst das eine, dann mit der erhaltenen Suspension das andere Pellet resuspendiert und auf einen sterilen auf einer LB-Agarplatte liegenden Nitrozellulosefilter getropft. Nach 6-24h Inkubation bei der Wachstumstemperatur des Rezipienten wurden die Zellen mit 1ml MgSO₄-Lösung vom Filter gespült und auf Selektivmedien in unterschiedlichen Verdünnungen ausplattiert.

Die Mobilisierung erfolgt analog, allerdings wird zusätzlich noch ein Helferstamm angezogen, der ein konjugatives Plasmid trägt und seine *tra*-Funktion dem mobilisierbaren Plasmid zu Verfügung stellt.

2.23.3 Minitransposonmutagenese

Die Minitransposonmutagenese wurde analog den Konjugationsexperimenten durchgeführt.

Eine einfache Methode zur Integration von Fremd-DNA in das Chromosom wurde von Herrero et al. (Herrero et al., 1990) entwickelt. Das Prinzip der Transposition bei der Minitransposonmutagenese wird hier anhand des Tn5-Minitransposonvektors pUT erläutert. Das Plasmid pUT besitzt den Replikationsursprung *ori* R6K des Plasmids R6K, für dessen Replikation das π -Protein benötigt wird. Das π -Protein wird vom *pir*-Lokus kodiert, der normalerweise in einem lysogenen Phagen im Chromosom integriert vorliegt. Weiterhin besitzt pUT die für ein Transposon typischen IS-Elemente und ein Transposasegen, den IS-Elementen benachbart, in *cis*. Das Plasmid kann in eine große Anzahl gram-negativer Bakterien mobilisiert werden, wird jedoch in ihnen nicht repliziert, wenn den Rezipienten das π -Protein fehlt. Nach der Mobilisierung des Plasmids in einen Rezipientenstamm durch Konjugation wird die Transposase synthetisiert und es kommt zur Transposition des Bereichs, der von den Termini der IS-Elemente umschlossen wird. Dieser Bereich wird somit stabil in das Chromosom integriert. Da das Plasmid im Rezipienten nicht repliziert werden kann, gehen mit dem Plasmid auch die Antibiotikaresistenz des Plasmids und das Transposasegen verloren. Daher wird nach dem Konjugationsexperiment der Erfolg der Transposition u.a. durch den Verlust der Antibiotikaresistenz überprüft.

3 Experimente und Ergebnisse

3.1 Ausgangsstämme

Als Rezipientenstämme für die Konstruktion Chlortoluol verwertender Organismen wurden *Pseudomonas putida* F1 sowie *Burkholderia* sp. PS12 aufgrund ihrer Abbaufähigkeiten in Hinsicht auf die Substrate Toluol beziehungsweise Chlorbenzol gewählt.

3.1.1 Substratspektren

Zur Ermittlung der Substratspektren der beiden Stämme *Pseudomonas putida* F1 und *Burkholderia* sp. PS12 wurden Wachstumstests auf festen Nährböden (2mM Substrat) sowie in Flüssigkultur (5mM Substrat) durchgeführt.

Tabelle 4: Wachstum des Stammes *Pseudomonas putida* F1 mit unterschiedlichen Substraten in festen und flüssigen Medien

Substrat	Agar	Flüssigkultur
Toluol	+	+
Benzylalkohol	(+)	(+)
Benzoat	+	+
2-Chlorbenzoat	-	-
3-Chlorbenzoat	-	-
4-Chlorbenzoat	-	-
2-Chlorbenzylalkohol	-	-
3-Chlorbenzylalkohol	-	-
2-Chlortoluol	-	-
3-Chlortoluol	-	-
4-Chlortoluol	-	-
<i>o</i> -Xylol	-	-
<i>m</i> -Xylol	-	-
<i>p</i> -Xylol	-	-
Benzol	+	+
Chlorbenzol	-	-
1,2,4-Trichlorbenzol	-	-
1,2,4,5-Tetrachlorbenzol	-	-

+ Wachstum
 - kein Wachstum
 (+) schwaches Wachstum

Der Stamm *Pseudomonas putida* F1 verwertet von den getesteten Substraten außer Toluol und Benzol, welche schon als Wachstumssubstrate beschrieben wurden, nur Benzoat als alleinige Kohlenstoffquelle. Das Wachstum mit Benzoat deutet darauf hin, daß der Stamm über eine Benzoat Dioxygenase verfügt. Klassische Benzoat Dioxygenasen aus Pseudomonaden verfügen in der Regel über eine signifikante Aktivität mit 3-Chlorbenzoat und 3-Methylbenzoat (Reineke und Knackmuss, 1978). Mit Benzylalkohol wurde nur ein schwaches Wachstum auf Agarplatten beobachtet, d.h. kleinere Koloniegrößen, ebenso nur leichte Trübung in Flüssigkultur, welches möglicherweise auf Kreuzreaktivität der Enzyme des Cymol Abbaufweges zurückzuführen ist (Eaton, 1997). Xylole und chlorierte Aromaten werden nicht als Wachstumssubstrate genutzt.

Tabelle 5: Wachstum des Stammes *Burkholderia* sp. PS12 mit unterschiedlichen Substraten in festen und flüssigen Medien

Substrat	Agar	Flüssigkultur
Toluol	+	+
Benzylalkohol	(+)	(+)
Benzoat	+	+
2-Chlorbenzoat	-	-
3-Chlorbenzoat	+	+
4-Chlorbenzoat	-	-
2-Chlorbenzylalkohol	-	-
3-Chlorbenzylalkohol	-	-
2-Chlortoluol	-	-
3-Chlortoluol	-	-
4-Chlortoluol	+	+
<i>o</i> -Xylol	-	-
<i>m</i> -Xylol	-	-
<i>p</i> -Xylol	-	-
Benzol	+	+
Chlorbenzol	+	+
1,4-Dichlorbenzol	+	+
1,2,4-Trichlorbenzol	+	+
1,2,4,5-Tetrachlorbenzol	+	+

+ Wachstum
 - kein Wachstum
 (+) schwaches Wachstum

Burkholderia sp. PS12 kann einige der getesteten Substrate als Wachstumssubstrate nutzen. Wachstum ist, wie in der Literatur beschrieben, mit Toluol, Benzoat, 3-Chlorbenzoat, 4-Chlortoluol, 1,4-Dichlorbenzol, 1,2,4-Trichlorbenzol und 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol zu beobachten (Sander et al., 1991; Beil et al., 1997). Zusätzlich konnte signifikantes Wachstum mit Benzol verzeichnet werden, welches nicht in der Literatur beschrieben war. Relativ schwaches Wachstum zeigte sich mit

Benzylalkohol als Substrat, was sich eventuell durch unspezifische Oxidationsreaktionen erklären läßt.

3.1.2 Sauerstoffaufnahmearten

Nur einige der untersuchten Substrate werden von *Pseudomonas putida* F1 oder *Burkholderia* sp. PS12 als Wachstumssubstrate verwertet. Es stellte sich die Frage, ob die Substrate, welche zum Wachstum nicht genutzt werden können, durch diese Organismen umgesetzt werden.

Aus diesem Grund wurde der Sauerstoffverbrauch in Anwesenheit dieser Substrate gemessen. Dazu wurden Zellen in einer optischen Dichte ($\lambda = 546\text{nm}$) von 1,0 verwendet und das Substrat in einer Konzentration von $300\mu\text{M}$ zugegeben.

Tabelle 6: Spezifische Sauerstoffaufnahmearten bei Inkubation von Toluol bzw. Benzol verwertenden Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1 mit verschiedenen Substraten

Anzuchtssubstrat	Toluol		Benzol	
Testsubstrat	$[\mu\text{mol O}_2/\text{min}]$	%	$[\mu\text{mol O}_2/\text{min}]$	%
Toluol	39	100	40	100
Benzol	2	5	18	45
Chlorbenzol	2	5	6	15
2-Chlortoluol	3	7	5	13
3-Chlortoluol	5	13	4	10
4-Chlortoluol	3	7	2	5
o-Xylol	1	3	2	5
m-Xylol	3	7	3	8
p-Xylol	2	5	2	5

Wachstum des Stammes mit Toluol oder Benzol führt zu eindeutiger Induktion des Umsatzes von Toluol. Die Toluol 2,3-Dioxygenase katalysiert laut Literatur die initiale Dioxygenierung von Toluol und Benzol (Gibson et al., 1974). Die Zellen zeigen nach Wachstum mit Toluol eine signifikante Sauerstoffaufnahmearten mit Toluol als Substrat, aber im Gegensatz dazu nur ca. 5% dieser Aktivität mit Benzol. Nach Gibson werden jedoch Toluol und Benzol durch Toluol verwertende Zellen mit nahezu identischer Aktivität (100:90) umgesetzt (Gibson et al., 1968). Daß die Toluol Dioxygenase, die als für diese Aktivitäten in Toluol verwertenden Zellen verantwortlich beschrieben wurde, Benzol und Toluol mit ähnlichen Raten umsetzt, wurde von Beil (persönliche Mitteilung) an *Escherichia coli* pSTO4 Zellen, die dieses Enzym überexprimieren, bestätigt. Interessanterweise zeigten Benzol

verwertende Zellen im Gegensatz zu Toluol verwertenden Zellen relativ höhere Sauerstoffaufnahme mit Benzol als Substrat, die den in der Literatur beschriebenen ähnlicher sind. Mit Chlorbenzol als Substrat wurden nur zwischen 5% (durch Toluol verwertende Zellen) und 15% (durch Benzol verwertende Zellen) der mit Toluol als Substrat beobachteten Sauerstoffaufnahme nachgewiesen.

Aktivitäten sind ebenfalls mit den weiteren Substraten erkennbar, d.h. mit sämtlichen chloresubstituierten Toluolen als auch Xylenen. Die geringste Aktivität wurde mit *ortho*-Xylol beobachtet.

Da ein erhöhter Sauerstoffverbrauch in Anwesenheit dieser Substrate nachgewiesen wurde, ist von einem Umsatz dieser Substrate durch eine Oxidation auszugehen. Um welche Art von Oxidation es sich in den einzelnen Fällen bzw. Substraten handelt, ist in weiteren Experimenten zu analysieren.

Entsprechend wurde die Sauerstoffaufnahme durch Zellen des Stammes *Burkholderia* sp. PS12 bestimmt. Um die Substratspezifität der Tetrachlorbenzol Dioxygenase zu ermitteln, wurden 3-Chlorbenzoat verwertende Zellen verwendet, in denen nach Sander (Sander et al., 1991) dieses Enzym induziert ist.

Tabelle 7: Spezifische Sauerstoffaufnahme bei Inkubation von 3-Chlorbenzoat verwertenden Zellen des Stammes *Burkholderia* sp. PS12 mit verschiedenen Substraten

Anzuchtssubstrat	3-Chlorbenzoat	
Testsubstrat	[$\mu\text{mol O}_2/\text{min}$]	%
Toluol	2	15
Benzol	<1	<1
Chlorbenzol	1	7
2-Chlortoluol	4	31
3-Chlortoluol	3	23
4-Chlortoluol	4	31
o-Xylol	<1	<1
m-Xylol	2	15
p-Xylol	2	15
1,4-Dichlorbenzol	8	62
1,2,4-Trichlorbenzol	13	100

3-Chlorbenzoat verwertende Zellen des Stammes *Burkholderia* sp. PS12 zeigen einen schnellen oxidativen Umsatz der höher chlorierten Substrate 1,2,4-Trichlorbenzol sowie 1,4-Dichlorbenzol, welche auch als Wachstumssubstrate dienen. Sander et al. beobachteten einen ähnlichen Umsatz

dieser beiden Substrate (Sander et al., 1991). Mit Chlorbenzol als Substrat wurde im Vergleich zu den Ergebnissen von Sander nur eine relativ niedrige Sauerstoffaufnahme beobachtet. Mit Benzol als Substrat zeigte sich, wie schon von Sander et al. beschrieben, kein Sauerstoffverbrauch (Sander et al., 1991). Die monochlorierten Toluole wurden mit signifikanten Aktivitäten umgesetzt. Trotz der relativ ähnlichen Sauerstoffaufnahme-Raten konnte ein Wachstum nur mit 4-Chlortoluol beobachtet werden. Auch die unchlorierten Substrate Toluol, *meta*- und *para*-Xylol werden mit signifikanten Aktivitäten umgesetzt, während die Aktivität mit *ortho*-Xylol unter der Nachweisgrenze lag.

3.1.3 Umsatzversuche

Da die beiden Stämme *Pseudomonas putida* F1 und *Burkholderia* sp. PS12 in der Lage sind, chlorierte Toluole und die isomeren Xylole umzusetzen, jedoch einzig 4-Chlortoluol ein Wachstumssubstrat für PS12 darstellt, wurde mittels HPLC überprüft, ob diese Verbindungen zu „dead-end“ Produkten umgesetzt werden. Dazu wurden die Substrate in einer Konzentration von 300 μ M zu Ruhezellen einer optischen Dichte von 10,0 ($\lambda = 546$ nm) zugesetzt. Das Kulturvolumen im Kolben betrug jeweils 10ml. Die Produktbildung wurde über vier Stunden mittels HPLC überprüft.

In Vorversuchen wurde untersucht, wie lange die Zellen für den Umsatz eines Substrates benötigen bzw. wie lange diese Zellen aktiv waren. Dazu wurde alle zehn Minuten eine Probe entnommen, diese zentrifugiert, und der Überstand mittels analytischer HPLC untersucht. Es zeigte sich, daß in allen Fällen spätestens nach vier Stunden keine Umsatzaktivitäten mehr erkennbar waren, d.h. kein weiterer Abbau des Substrates, falls noch vorhanden, und keine weitere Veränderung der Produktzusammensetzung. Somit wurden alle Ansätze vier Stunden lang mittels HPLC überprüft.

Die Produkte werden durch Vergleich der Retentionsvolumina und der *in-situ*-UV-Spektren mit authentischen Standards charakterisiert und quantifiziert.

**Tabelle 8: Produkte nach Umsatz verschiedener Substrate durch Toluol
verwertende Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1**

Substrat 300µM	Produkt	Zeit [h]	Konzentration des Produktes [µM]
Chlorbenzol	3-Chlorbrenzkatechin	0	29
		1	245
		4	114
2-Chlortoluol	2-Chlorbenzylalkohol	0	19
		1	181
		4	<1
	2-Chlorbenzoat	0	<1
		1	120
		4	284
3-Chlortoluol	3-Chlorbenzylalkohol	0	9
		1	28
		4	<1
	3-Chlorbenzoat	0	3
		1	229
		4	247
4-Chlortoluol	3-Chlor-6-methylbrenzkatechin	0	6 AE
		1	218 AE
		4	118 AE
<i>ortho</i>-Xylol	2-Methylbenzylalkohol	0	31
		1	291
		4	80
	2-Methylbenzoat	0	6
		1	50
		4	137
<i>meta</i>-Xylol	3-Methylbenzylalkohol	0	140
		1	238
		4	<1
	3-Methylbenzoat	0	7
		1	104
		4	45

AE Absorptionseinheiten (x1000)

Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß in Toluol verwertenden Zellen eine Dioxygenase Aktivität induziert ist. Chlorbenzol wird zu 3-Chlorbrenzkatechin und 4-Chlortoluol zu 3-Chlor-6-methylbrenzkatechin umgesetzt. Die Abnahme der Konzentrationen an Chlorbrenzkatechinen im weiteren Versuchsverlauf ist auf Instabilität dieser Verbindungen zurückzuführen.

2- und 3-Chlortoluol werden jedoch nicht dioxygeniert, es kommt zu einer Monooxygenierung dieser Substrate an der Methylseitenkette. Die intermediär gebildeten Chlorbenzylalkohole unterliegen einer langsamen weiteren Oxidation zu den entsprechenden Chlorbenzoaten. Die nahezu quantitative Akkumulation der Chlorbenzoate zeigt, daß eine Dioxygenierung des aromatischen Ringes nur in geringem Maß stattfindet.

Auch bei *ortho*- und *meta*-Xylol beobachtet man eine Monooxygenierung einer der Methylseitenketten, welche zur Bildung von intermediärem Methylbenzylalkohol führt. Diese Intermediate werden langsam zu den entsprechenden Methylbenzoaten oxidiert. Während 2-Methylbenzoat akkumuliert, unterliegt 3-Methylbenzoat scheinbar einem weiteren Metabolismus.

Die Toluol 2,3-Dioxygenase des Stammes *Pseudomonas putida* F1 wurde mir, kloniert in dem Plasmid pSTO4 in *Escherichia coli* DH5 α (persönliche Mitteilung von Stefan Beil), zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe dieses Stammes sollte geprüft werden, ob diese Dioxygenase für die beobachtete Monooxygenierung verantwortlich ist.

Die Dioxygenase wurde durch Zugabe von IPTG während des Wachstums im Komplexmedium induziert. Die geernteten Zellen wurden in einer OD_{546nm} von 10,0 in Phosphat-Puffer für das Umsatzexperiment resuspendiert. Eine Zugabe von Glukose in den Umsatzkolben sollte die Versorgung mit Reduktionsäquivalenten während des Umsatzes der chloresubstituierten Toluole und des Chlorbenzols sicherstellen.

**Tabelle 9: Produkte nach Umsatz verschiedener Substrate durch den Stamm
 E. coli pSTO4**

Anzuchtssubstrat			LB + Amp ₁₀₀ + 1mM IPTG	LB + Amp ₁₀₀ + 1mM IPTG
				+ 10mM Glukose im Umsatzkolben
Substrat 300µM	Produkt	Zeit [h]	Konzentration [µM]	Konzentration [µM]
Chlorbenzol	3-Chlor-3,5- Cyclohexadien-1,2- Dihydrodiol	0	4 AE	4 AE
		1	20 AE	34 AE
		2	32 AE	33 AE
		4	40 AE	34 AE
2-Chlortoluol	2-Chlorbenzylalkohol	0	13	5
		1	85	183
		2	126	214
		4	140	220
	2-Chlorbenzoat	0	<1	<1
		1	<1	<1
		2	<1	<1
		4	<1	<1
3-Chlortoluol	3-Chlorbenzylalkohol	0	6	3
		1	56	61
		2	83	63
		4	96	64
	3-Chlorbenzoat	0	<1	<1
		1	<1	<1
		2	<1	<1
		4	<1	<1
4-Chlortoluol	3-Chlor-6-methyl-3,5- cyclohexadien-1,2- dihydrodiol	0	16 AE	19 AE
		1	177 AE	424 AE
		2	325 AE	425 AE
		4	432 AE	431 AE

AE Absorptionseinheiten (x1000)

Wie erwartet werden Chlorbenzol und 4-Chlortoluol durch *Escherichia coli* pSTO4 zu den entsprechenden Dihydrodiolen umgesetzt. 2- und 3-Chlortoluol unterliegen einer Monooxygenierung durch die Toluol 2,3-Dioxygenase. Die entstehenden Chlorbenzylalkohole werden nicht weiter umgesetzt.

Die kritischen Schritte beim Metabolismus von 2- und 3-Chlortoluol durch den Stamm *Burkholderia* sp. PS12 wurden ebenfalls durch Umsatzexperimente analysiert, indem 3-Chlorbenzoat verwertende Zellen des Stammes mit diesen Substraten inkubiert wurden.

Die Akkumulation von jeweils zwei Metaboliten konnte anhand von Retentionsvolumina und UV-Spektren im Vergleich zu den entsprechenden Standards nachgewiesen werden. Bei Umsatz von 2-Chlortoluol konnte die Bildung von 2-Chlorbenzylalkohol mit einer Rate von $28\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g Protein})$ beobachtet werden, was der gemessenen Sauerstoffaufnahme mit 2-Chlortoluol entspricht. Der weitere Metabolismus vom Alkohol zum Benzoat war mit einer Rate von $4\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g Protein})$ viel langsamer. 80% des eingesetzten 2-Chlortoluols konnten zu Ende des Experimentes als 2-Chlorbenzoat wiedergefunden werden, was darauf schließen läßt, daß eine Dioxygenierung des aromatischen Ringes, wie vorher auch für den Umsatz von 2-Chlortoluol durch *Pseudomonas putida* F1 gezeigt, nur in geringem Ausmaß stattfindet. 3-Chlortoluol als Substrat wurde mit einer Rate von $37\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g Protein})$ zu 3-Chlorbenzylalkohol umgesetzt, und mit einer Rate von $5\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g Protein})$ weitermetabolisiert. Eine Akkumulation von 3-Chlorbenzoat wurde nicht beobachtet. Es ist davon auszugehen, daß sämtliches gebildetes 3-Chlorbenzoat durch die verwendeten 3-Chlorbenzoat verwertenden Zellen sofort weiter umgesetzt wurde.

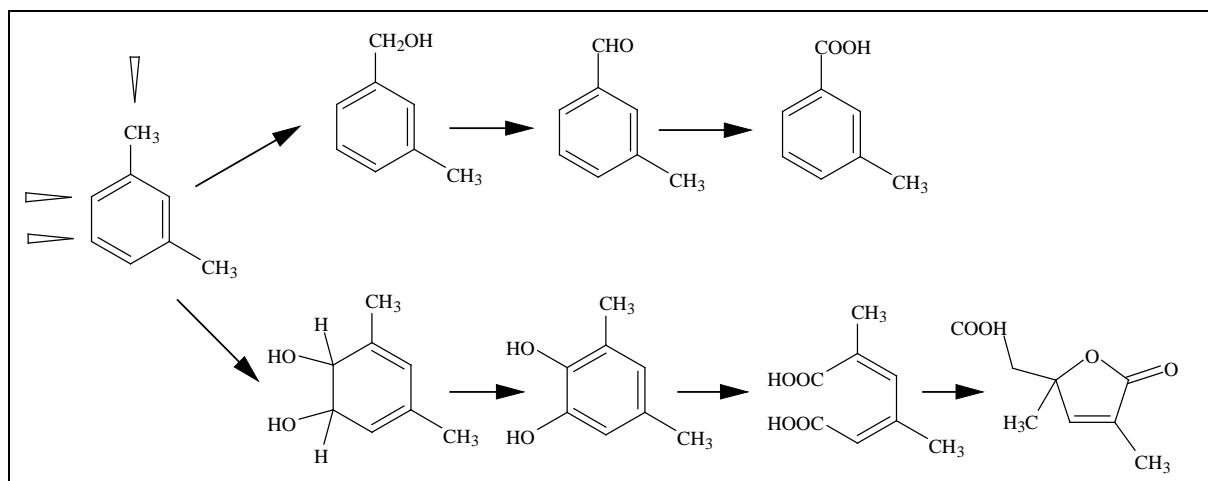
Da auch *ortho*- und *meta*-Xylol durch *Burkholderia* sp. PS12 umgesetzt werden, sollte analysiert werden, ob dieses, analog zu der an den entsprechenden Chlortoluolen beobachteten Reaktion, durch Monooxygenierung erfolgt. Somit wurden die durch 3-Chlorbenzoat verwertende Zellen des Stammes *Burkholderia* sp. PS12 gebildeten Produkte analysiert.

Tabelle 10: Produkte nach Umsatz von *ortho*- und *meta*-Xylol durch 3-Chlorbenzoat verwertende Zellen des Stammes *Burkholderia* sp. PS12

Substrat 300µM	Produkt	Zeit [h]	Konzentration [µM]
<i>ortho</i> -Xylol	2-Methylbenzylalkohol	0	<1
		1	120
		2	147
		4	150
	2-Methylbenzoat	0	<1
		1	<1
		2	<1
		4	<1
<i>meta</i> -Xylol	3-Methylbenzylalkohol	0	<1
		1	276
		2	264
		4	287
	3-Methylbenzoat	0	<1
		1	6
		2	6
		4	4
	2,4-Dimethylacton	0	<1
		1	74
		2	83
		4	88

Auch die Substrate *ortho*- und *meta*-Xylol unterliegen der Monooxygenierung einer Methylgruppe. *ortho*-Xylol wird zu 2-Methylbenzylalkohol metabolisiert, während *meta*-Xylol entsprechend zu 3-Methylbenzylalkohol umgesetzt wird. Folgesubstrate durch weitere Dehydrogenierungen wurden nicht oder nur in geringen Mengen gefunden.

Die hohen Mengen an akkumulierenden Benzylalkoholen zeigen, daß auch hier die Monooxygenierung die bevorzugte Reaktion ist. Eine Dioxygenierung von zum Beispiel *meta*-Xylol sollte nach Dehydrogenierung zu 3,5-Dimethylbrenzkatechin führen. Da 3-Chlorbenzoat verwertende Zellen des Stammes *Burkholderia* sp. PS12 (siehe Tabelle 12) große Mengen an Chlorbrenzkatechin 1,2-Dioxygenase induzieren, sollte dieser Metabolit in den *ortho*-spaltenden Abbauweg geleitet werden, und letztendlich 2,4-Dimethylacton als „dead-end“ Produkt gebildet werden. Somit bietet die Quantifizierung der Akkumulation von Dimethylactonen aus Xylolen ein einfaches Verfahren der Analyse der Signifikanz von Xylol Dioxygenierungen durch den Stamm *Burkholderia* sp. PS12. Entsprechend konnte die Akkumulation von 2,4-Dimethylacton aus *meta*-Xylol nachgewiesen werden, ohne daß Hinweise auf die Akkumulation von Dihydrodiolen oder Methylbrenzkatechinen beobachtet wurden. Es ist davon auszugehen, daß *meta*-Xylol zu $\frac{3}{4}$ einer Monooxygenierung zu 3-Methylbenzylalkohol und zu $\frac{1}{4}$ einer Dioxygenierung mit 2,4-Dimethylacton als Endprodukt unterliegt.

Abbildung 9: Mono- und Dioxygenierung des *meta*-Xylol

3.1.4 Enzymtests

Die Analyse der Enzymaktivitäten der Stämme bei Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen vermittelt Informationen über die jeweils genutzten Abbauewege.

Für den Stamm *Pseudomonas putida* F1 war zu klären, ob ein 3-Oxoadipat-Weg vorhanden ist, und ob und wie dieser Stamm Benzoat umsetzt.

Tabelle 11: Spezifische Aktivitäten verschiedener Enzyme des Stammes *Pseudomonas putida* F1

Anzuchtssubstrat		Benzoat	Toluol	Benzol
Enzym	Substrat in Meßzelle	Aktivität [U/g]	Aktivität [U/g]	Aktivität [U/g]
Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase	Brenzkatechin	1	140	20
Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase	Brenzkatechin	190	<1	320
	3-Methylbrenzkatechin	n.b.	<1	n.b.
	3-Chlorbrenzkatechin	50	<1	3
<i>cis</i> -3,5-Cyclohexadien-1,2-diol Dehydrogenase	<i>cis</i> -3,5-Cyclohexadien-1,2-diol	n.b.	80	n.b.
Benzylalkohol Dehydrogenase	Benzylalkohol	10	n.b.	<1
	2-Chlorbenzylalkohol	10	n.b.	<1
	3-Chlorbenzylalkohol	10	n.b.	<1
Benzaldehyd Dehydrogenase	Benzaldehyd	1	8	<1
	2-Chlorbenzaldehyd	2	5	<1
	3-Chlorbenzaldehyd	1	10	<1

n.b. nicht bestimmt
<1 nicht detektierbar

Bei *Pseudomonas putida* F1 erfolgt bei Wachstum mit Toluol wie erwartet eine Induktion des *meta*-Weges. Die dafür verantwortliche 3-Methylbrenzkatechin 2,3-Dioxygenase (*todE*) des Stammes *Pseudomonas putida* F1 ist in einem Operon mit der Toluol Dioxygenase (*todABC1C2*) organisiert. Die Induktion durch Toluol bzw. dessen Derivate führt zur Transkription des kompletten Operons (*todFC1C2BADE*) (Zylstra et al., 1988).

Bei Wachstum mit Benzoat konnte, wie für Benzoat-Abbauer die Regel (Stanier und Ornston, 1973), nur die Induktion einer Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase nachgewiesen werden. Dieses läßt den Schluß zu, daß dieser Stamm einen 3-Oxadipat-Abbauweg besitzt. Benzol verwertende Zellen induzieren, zusätzlich zur Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase hohe Aktivität der Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase.

Es konnten nur sehr geringe Aktivitäten einer Benzylalkohol und Benzaldehyd Dehydrogenase gemessen werden, so daß man davon ausgehen kann, daß dieser Stamm keine Enzyme mit entsprechenden Aktivitäten aufweist, oder diese, falls vorhanden, durch die Wachstumssubstrate nicht induziert wurden.

Burkholderia sp. PS12 baut chlorierte Substrate über den Chlorbrenzkatechin Abbauweg ab. Die für den Abbau von Chlorbenzolen verantwortlichen Gene sind vermutlich, wie für *Pseudomonas* sp. P51 beschrieben (van der Meer et al., 1991a und b), in zwei Operons lokalisiert, von denen das erste für eine Tetrachlorbenzol Dioxygenase und eine Dihydrodiol Dehydrogenase (Beil et al., 1997) und das zweite für Enzyme des Chlorbrenzkatechin Abbaus kodiert. Die für Enzyme des oberen Abbauweges kodierenden Genregionen aus *Burkholderia* sp. PS12, *Pseudomonas* sp. P51 und *Pseudomonas putida* F1 sind äußerst homolog. Während jedoch das Operon des Stammes *Pseudomonas putida* F1 für eine funktionale Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase kodiert, kodiert das analoge Gen des Stammes *Burkholderia* sp. PS12 nicht für ein funktionales Enzym. Entsprechend zeigen Zellen des Stammes *Burkholderia* sp. PS12, die verschiedene Chlorbenzole verwerten, keine Induktion einer *meta*-spaltenden Enzymaktivität. *Burkholderia* sp. PS12 ist jedoch befähigt, mit Toluol als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Der Umsatz von Toluol durch die Tetrachlorbenzol Dioxygenase führt, wie derjenige durch die Toluol Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* F1 zu 3-Methyl-3,5-cyclohexadien-1,2-diol und somit zu 3-Methylbrenzkatechin als Intermediat.

Während in Pseudomonaden 2-Methylacton als „dead-end“ Produkt des Abbaus von 3-Methylbrenzkatechin nach *ortho*-Spaltung beschrieben wurde (Catelani et al., 1971; Knackmuss et al., 1976), ist *Burkholderia* sp. PS12 in der Lage, 2-Methylacton als Wachstumssubstrat zu nutzen (Pieper, persönliche Mitteilung), was zeigt, daß ein Abbau von Toluol durch diesen Stamm über einen modifizierten *ortho*-Weg erfolgen kann.

Um den Abbau von Toluol durch diesen Stamm zu analysieren, wurden charakteristische Enzymaktivitäten bestimmt.

Tabelle 12: Spezifische Aktivitäten verschiedener Enzyme des Stammes *Burkholderia* sp. PS12

Anzuchtssubstrat		Toluol	3-Chlorbenzoat
Enzym	Substrat in Meßzelle	Aktivität [U/g]	Aktivität [U/g]
Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase	Brenzkatechin	80	<1
Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase	Brenzkatechin	<1	500
	3-Methylbrenzkatechin	<1	n.b.
	3-Chlorbrenzkatechin	<1	110
<i>cis</i> -3,5-Cyclohexadien-1,2-diol Dehydrogenase	<i>cis</i> -3,5-Cyclohexadien-1,2-diol	60	n.b.
Dienlacton Hydrolase	<i>cis</i> -Dienlacton	<1	n.b.
Benzylalkohol Dehydrogenase	Benzylalkohol	n.b.	1
	2-Chlorbenzylalkohol	n.b.	<1
	3-Chlorbenzylalkohol	n.b.	4
Benzaldehyd Dehydrogenase	Benzaldehyd	2	3
	2-Chlorbenzaldehyd	2	<1
	3-Chlorbenzaldehyd	7	20

n.b. nicht bestimmt
<1 nicht detektierbar

Burkholderia sp. PS12 zeigt wie erwartet bei Wachstum mit 3-Chlorbenzoat eine hohe Aktivität der Chlorbrenzkatechin 1,2-Dioxygenase. In diesem Fall ist keine Induktion eines Brenzkatechin *meta*-spaltenden Enzyms zu verzeichnen. Bei Wachstum mit Toluol induziert *Burkholderia* sp. PS12 signifikante Aktivität einer Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase, jedoch keine Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase, so daß davon auszugehen ist, daß intermediäres 3-Methylbrenzkatechin über einen *meta*-spaltenden Abbauweg verstoffwechselt wird. Das Gen der für den Abbau verantwortlichen 3-Methylbrenzkatechin 2,3-Dioxygenase ist jedoch nicht, wie bei *Pseudomonas putida* F1, in einem Operon mit dem für die initiale Dioxygenase kodierenden Gen lokalisiert.

Es konnten keine relevanten Aktivitäten einer Benzylalkohol Dehydrogenase oder einer Benzaldehyd Dehydrogenase mit unchlorierten Substraten gemessen werden. Mit 3-Chlorbenzaldehyd als Substrat zeigte sich ein geringer Umsatz.

Die Toluol Dioxygenase und die Tetrachlorbenzol Dioxygenase stellen die ersten Enzymsysteme dar, die 2-Chlortoluol mit signifikanter Aktivität umsetzen, und sollen, wie im Weiteren erläutert, als ein katabolisches Segment für die Konstruktion Chlortoluol mineralisierender Mikroorganismen verwendet werden. Ein solches Verfahren ist jedoch nur sinnvoll, wenn Chlortoluole auch Induktoren der Toluol Dioxygenase darstellen.

Aus diesem Grund wurde getestet, ob Chlortoluole die Toluol Dioxygenase des Stammes *Pseudomonas putida* F1 induzieren können. Hierzu wurden Zellen des Stammes *Pseudomonas putida*

F1 in einem Medium angezogen, welches neben 5mM Glukose als Wachstumssubstrat zusätzlich jeweils 0,5mM des auf Induktionsfähigkeit zu testenden Substrates enthielt.

Tabelle 13: Spezifische Sauerstoffaufnahmearten von Glukose (inkl. 0,5mM anderer Substrate) verwertenden Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1

Anzuchtssubstrat	5mM Glukose + 0,5mM Toluol		5mM Glukose + 0,5mM 3-Chlortoluol	
Testsubstrat	[$\mu\text{mol O}_2/\text{min}$]	%	[$\mu\text{mol O}_2/\text{min}$]	%
Toluol	17	100	36	100
Chlorbenzol	2	12	5	14
2-Chlortoluol	3	18	2	6
3-Chlortoluol	2	12	1	3
4-Chlortoluol	1	6	2	6

Anzuchtssubstrat	5mM Glukose + 0,5mM Chlorbenzol		5mM Glukose + 0,5mM 2-Chlortoluol	
Testsubstrat	[$\mu\text{mol O}_2/\text{min}$]	%	[$\mu\text{mol O}_2/\text{min}$]	%
Toluol	58	100	25	100
Chlorbenzol	6	10	3	12
2-Chlortoluol	2	3	2	8
3-Chlortoluol	2	3	1	4
4-Chlortoluol	<1	<1	<1	<1

Glukose verwertende Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1 zeigten keine konstitutive Expression der Toluol Dioxygenase (Negativkontrolle).

Die Zugabe von Toluol, Chlorbenzol oder den verschiedenen Isomeren des Chlortoluols zum Wachstumsmedium resultierte in einer eindeutigen Induktion der Toluol Dioxygenase.

3.2 Konstruktionsplanung

Um die Problematik des simultanen Abbaus der drei verschiedenen monochlorierten Toluole zu lösen, werden, wie aus obigen Untersuchungen hervorgeht, unterschiedliche Abbaufähigkeiten aus diversen Stämmen benötigt.

Zur Mineralisierung benötigt man mindestens vier verschiedene Abbausequenzen:

1. Eine Chlorbenzol oder Toluol Dioxygenase, welche die Methylgruppe von 2- und 3-Chlortoluol zum korrespondierenden Alkohol oxidiert und 4-Chlortoluol dioxygeniert. Das aus 4-Chlortoluol gebildete Dihydrodiol kann durch in der Regel in einem Operon mit der Dioxygenase kodierte Dehydrogenasen zu 3-Chlor-6-methylbrenzkatechin umgewandelt werden.
2. Eine Benzylalkohol Dehydrogenase und eine Benzaldehyd Dehydrogenase, welche die Alkohol-Seitenkette von chlosubstituierten Benzylalkoholen mit signifikanter Aktivität zur Carbonsäureseitenkette aufoxidieren.
3. Eine 2-Chlorbenzoat Dioxygenase, welche 2-Chlorbenzoat in 1,2-Position dioxygeniert. Das hierbei gebildete Dioxygenierungsprodukt ist instabil und rearomatisiert spontan unter CO_2 - und Chlorideliminierung zu Brenzkatechin. 2-Chlorbenzoat 1,2-Dioxygenasen sind in der Lage, ebenfalls 3-Chlorbenzoat zu dioxygenieren. Zum Umsatz von 3-Chlorbenzoat zu 3-Chlorbrenzkatechin ist neben einer 2-Chlorbenzoat 1,2-Dioxygenase oder Benzoat Dioxygenase zusätzlich eine 1,2-Dihydro-1,2-dihydroxybenzoat Dehydrogenase notwendig.
4. Enzyme, welche die Chlorbrenzkatechine/Brenzkatechine weiter metabolisieren können, d. h. einen Brenzkatechin Abbauweg (*meta*-spaltenden oder einen 3-Oxadipat-Weg) zur Mineralisierung von Brenzkatechin und einen Chlorbrenzkatechin Abbauweg zum Abbau von chlorierten Brenzkatechinen.

Vereinigt man diese beschriebenen Abbausequenzen in einem Stamm, so sollte dieser theoretisch befähigt sein, zumindest zwei der monochlorierten Toluole mineralisieren zu können, 2-Chlortoluol und 3-Chlortoluol. Im Fall des 4-Chlortoluols kann es zu Fehlleitungen im Abbau kommen, wenn zusätzlich zur vorhandenen Dioxygenase eine Monooxygenase eingebracht wird, welche die Reaktion zum 4-Chlorbenzoat katalysiert. Dieses Produkt würde aufgrund einer fehlenden Toluat Dioxygenase einen Endmetaboliten darstellen.

Diese mögliche Fehlleitung sollte im Rahmen der Ergebnisse analysiert werden.

3.2.1 Rezipientenstämme

Als Ausgangsorganismen zur Konstruktion eines Chlortoluol verwertenden Stammes bieten sich Organismen an, welche schon von Natur aus einige dieser Sequenzen mit sich bringen.

So wurden als Rezipienten die schon beschriebenen Stämme *Pseudomonas putida* F1 und *Burkholderia* sp. PS12 gewählt.

Burkholderia sp. PS12 beinhaltet eine Chlorbenzol Dioxygenase sowie Chlorbrenzkatechin abbauende Enzyme. Von den drei verschiedenen Chlortoluolen kann durch diesen Stamm nur das 4-Chlortoluol als Wachstumssubstrat genutzt werden.

Dieses Substrat wird durch die Chlorbenzol Dioxygenase umgesetzt und über 3-Chlor-6-methylbrenzkatechin mittels intradioler Spaltung weiter metabolisiert. 2-Chlortoluol sowie 3-Chlortoluol werden quantitativ an der Methylseitenkette zum entsprechenden Alkohol monooxygeniert. Eine weitere Oxidation verläuft anschließend nur langsam. 3-Chlorbenzoat kann im Gegensatz zu 2-Chlorbenzoat als Wachstumssubstrat genutzt werden.

Pseudomonas putida F1 besitzt eine Toluol 2,3-Dioxygenase, welche als initialen Schritt die Bildung eines *cis*-Toluol-2,3-dihydrodiols unter Addition eines zweiatomigen Sauerstoffs katalysiert. Die weitere Mineralisierung verläuft über eine Dehydrogenierung zum 3-Methylbrenzkatechin und anschließender extradiolischer Spaltung durch die Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase. 4-Chlortoluol kann aufgrund einer fehlenden Chlorbrenzkatechin Dioxygenase nur bis zum 3-Chlor-6-methylbrenzkatechin umgesetzt und nicht weiter metabolisiert werden. 2-Chlortoluol bzw. 3-Chlortoluol werden quantitativ zum entsprechenden Alkohol monooxygeniert und können nur über langsame, unspezifische Reaktionen weiter oxidiert werden. Im Gegensatz zu *Burkholderia* sp. PS12 kann *Pseudomonas putida* F1 3-Chlorbenzoat nicht als Wachstumssubstrat nutzen.

3.2.2 Benötigte Sequenzen

Um einen vollständigen Abbau von Chlortoluolen zu gewährleisten, fehlen diesen Rezipientenstämmen somit einige Abbausequenzen; zum einen Dehydrogenasen, welche mit hoher Aktivität die Methylseitenkette der intermediären Chlorbenzylalkohole zu den korrespondierenden Carbonsäuren aufoxidieren und zum anderen eine 2-Chlorbenzoat Dioxygenase. Im Fall von *Pseudomonas putida* F1 fehlen zusätzlich noch Sequenzen zum Abbau von Chlorbrenzkatechin.

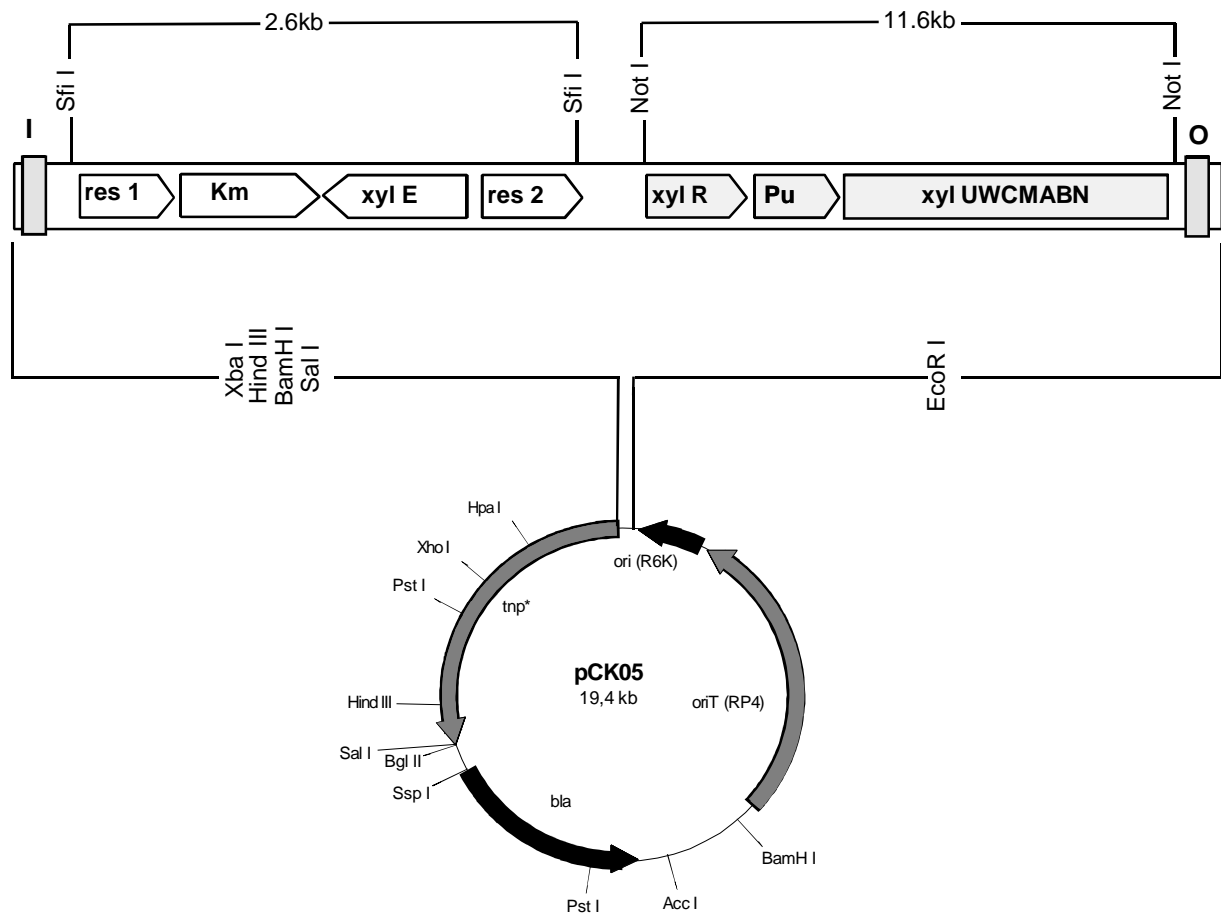
3.2.3 Vorhandene Genkassetten

Zur Integration der für fehlende Abbausequenzen kodierenden Gene in das Chromosom der Empfängerstämmen wurden auf einem pUT-Vektor befindliche Minitransposonkassetten verwendet, welcher neben der in Insertionssequenzen eingeschlossenen Genkassette ein Gen für Ampicillin-Resistenz (*bla*), einen Replikationsursprung (*oriR6K*), einen Transferursprung zur Mobilisierung (*oriTRP4*) und ein Transposase-Gen (*tnp*) aufweist (de Lorenzo und Timmis, 1994).

3.2.3.1 Obere Toluol Abbaugene des Plasmides pWW0

Die verwendete Genkassette enthält unter anderem die für Benzylalkohol und Benzaldehyd Dehydrogenase mit breiter Substratspezifität kodierenden Gene des oberen Toluol Abbauweges des Plasmides pWW0 (TOL-Plasmid).

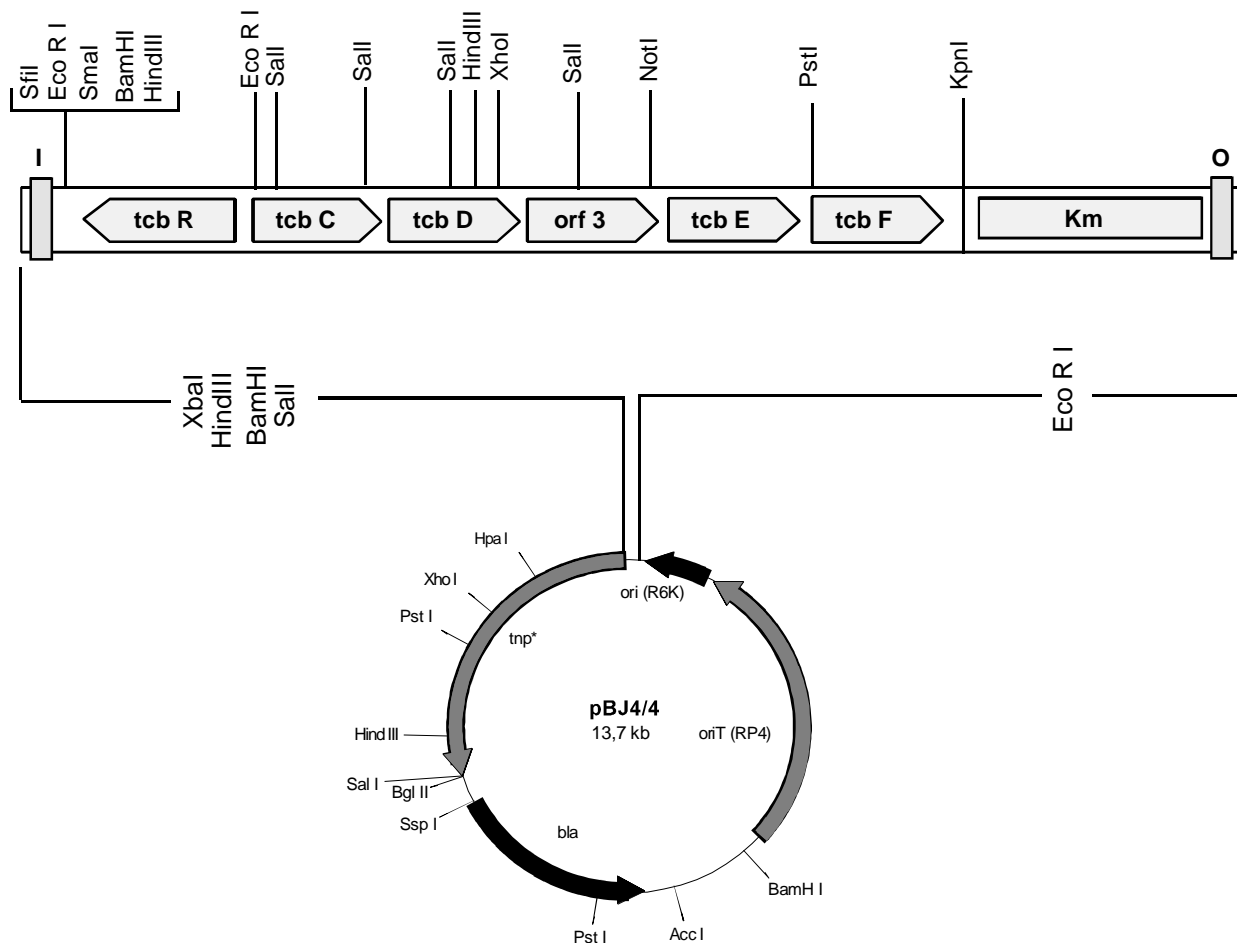
Die auf dem Plasmid pCK05 (siehe Abbildung 10) lokalisierte Minitransposon Kassette, welche uns freundlicherweise von Sven Panke zur Verfügung gestellt wurde (Panke et al., 1998), beinhaltet sämtliche für die Oxidation von Toluol, *m*-Xylol und *p*-Xylol zu Benzoat bzw. *m*- oder *p*-Toluat notwendigen Gene, d. h. die Strukturgene *xy*/MA (Xylol Oxygenase), *xy*/B (Benzylalkohol Dehydrogenase) und *xy*/C (Benzaldehyd Dehydrogenase), sowie das Gen für den positiven Regulator (XylR). Das Gen *xy*/N kodiert für ein Protein unbekannter Funktion (Harayama et al., 1989) und die Gene, *xy*/U und *xy*/W, welche ebenfalls keine bekannte Funktion im Abbau von Toluol aufweisen (Williams et al., 1997), sind ebenfalls in dieser Kassette vorhanden. Substrate der Enzyme des oberen Abbauweges induzieren durch Interaktion mit XylR (konstitutiv exprimiert) die Transkription von Pu aus (Assinder und Williams, 1990). Als Induktoren fungieren Toluol, *m*-Xylol und *p*-Xylol, sowie ihre entsprechenden Alkohol-Abkömmlinge. Weiterhin können 3- und 4-Chlortoluol, 3-Ethyltoluol und 1,3,4-Trimethylbenzol, als Substrate dieses Abbauweges, induzieren, aber auch andere Kohlenwasserstoffe, die nicht durch diese Enzyme metabolisiert werden wie *o*-Xylol, 2-Chlortoluol, 2- und 4-Ethyltoluol, sowie einige dreifach substituierte Benzole (Abril et al., 1989). 2-Chlorbenzylalkohol fungiert ebenfalls als Induktor dieses Operons, was Brinkmann und Reineke durch die Konstruktion eines 2-Chlorbenzylalkohol Abbauers zeigen konnten (Brinkmann und Reineke, 1992). Das uns zur Verfügung gestellte Plasmid enthält zusätzlich zu den zu übertragenden Strukturgenen innerhalb der sich wiederholenden Sequenzen des Transposons eine Sequenz zweier Selektionsmarker (Km und *xy*/E). Dem Kanamycin-Resistenzgen ist ein Promotor vorgeschaltet, das Gen *xy*/E ist jedoch promotorlos (Kristensen et al., 1995) und wird je nach Integration in das Genom mehr oder weniger intensiv abgelesen. Diese Gene sind von sogenannten *res* Sequenzen flankiert, welche von dem Enzym Resolvase erkannt werden, und inklusive der dazwischenliegenden Sequenzen nach Integration in das Chromosom des Rezipienten selektiv herausgeschnitten werden können, so daß resistenzfreie Derivate erhalten werden.

Abbildung 10: Plasmid pCK05

3.2.3.2 Chlorbrenzkatechin Abbaugene

Die Gene, welche für Enzyme zum Chlorbrenzkatechin Abbau kodieren, stammen von dem Plasmid pP51 (van der Meer et al., 1991a und b), und sind ebenfalls in einem Operon organisiert. Dieses enthält die Gene *tcbCDEF*, welche für die Enzyme Chlorbrenzkatechin 1,2-Dioxygenase (*TcbC*), Chlormuconsäure Cycloisomerase (*TcbD*), Dienlacton Hydrolase (*TcbE*) und Maleylacetat Reduktase (*TcbF*) kodieren.

Die Strukturgene sind einschließlich des positiven Regulators *tcbR* und einer Kanamycin-Resistenz als Genkassette in einem Minitransposon auf dem Plasmid pBJ4/4 (siehe Abbildung 11) vorhanden, welches mir freundlicherweise von Barbara Jakobs zur Verfügung gestellt wurde.

Abbildung 11: Plasmid pBJ4/4

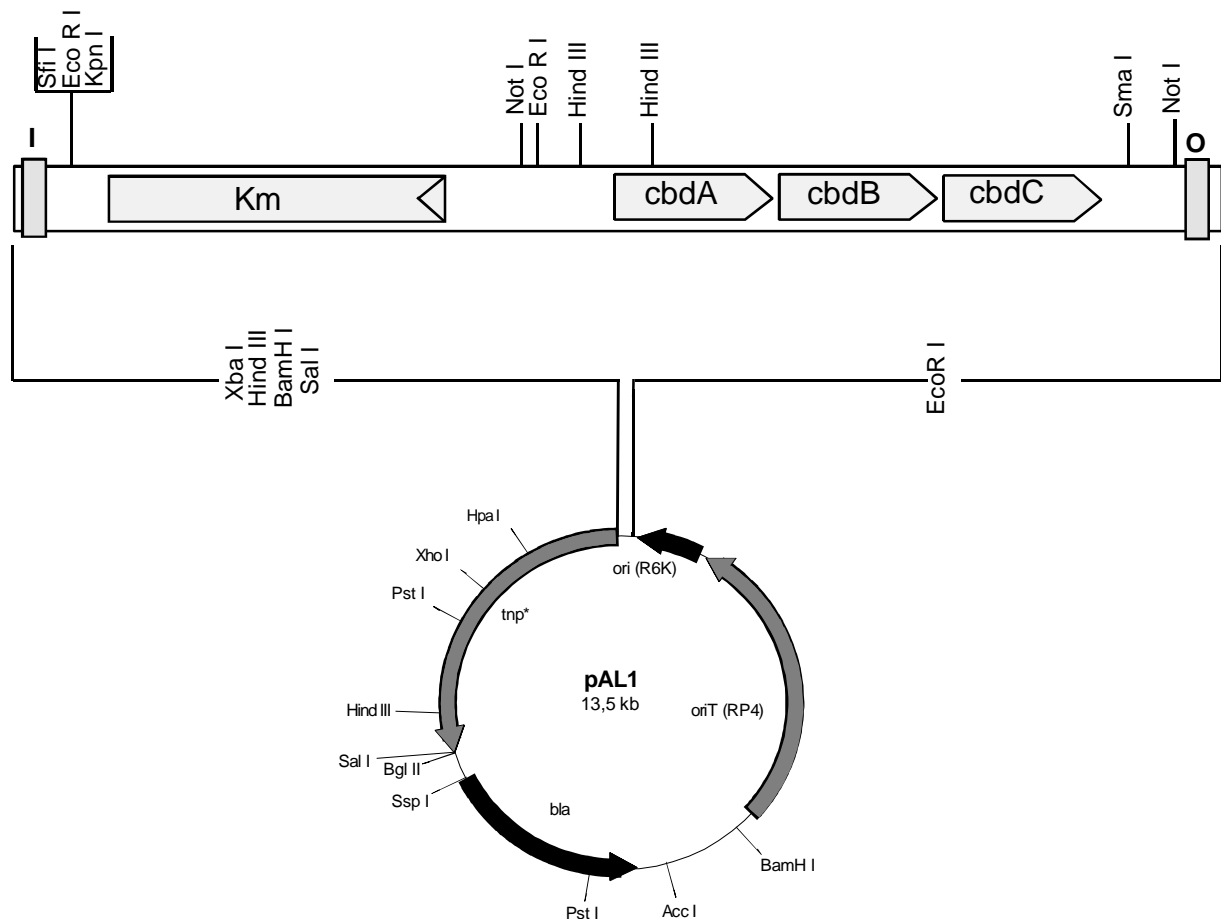
3.2.3.3 2-Halobenzoat Dioxygenase Gene

Die in dieser Arbeit verwendeten für die 2-Halobenzoat 1,2-Dioxygenase kodierenden Gene entstammen dem Plasmid pBAH1 des Stammes *Pseudomonas cepacia* 2CBS und liegen geklont in dem „broad-host-range“-Vektor pKT231+ 6,0kb EcoRI Fragment „*cbdABC*“ (Haak et al., 1995), im weiteren pKT231cbd genannt, vor. Haak et al. klonierten ein 7,0kb *SmaI* Fragment des Plasmides pBAH1, welches die Gene *cbdABC* enthielt, in einen pUC18 Vektor, von dem ein 6,0kb *EcoRI* Hybridfragment in den Vektor pKT231 subkloniert wurde. Das so entstandene Plasmid pKT231cbd wurde mir freundlicherweise von Susanne Fetzner zur Verfügung gestellt. Das Gen *cbdA* kodiert für die große Untereinheit der terminalen Oxygenase, *cbdB* für die kleine Untereinheit und *cbdC* für die NADH:Akzeptor-Reduktase. Dieses Multikomponenten-Enzym katalysiert die Oxidation von 2-Chlorbenzoat zu Brenzkatechin. Das Plasmid pKT231cbd ist ein „broad-host-range“ Vektor und kann durch Konjugation in verschiedene Rezipienten übertragen werden und dort replizieren. Für die stabile Integration der entsprechenden Gensequenzen in das Genom des Rezipienten mußten diese in einen Minitransposonvektor umklont werden.

3.2.4 Konstruktion der 2-Halobenzoat Dioxygenase Kasette

Das Plasmid pKT231cbd wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut. Im Agarosegel konnte das 6,0kb Fragment mit den Genen *cbdABC* vom restlichen Vektor (13kb) getrennt werden. Aus einem präparativen Agarosegel wurde das 6,0kb Fragment isoliert, aufgereinigt, mit *SmaI* verdaut und in die „multicloning site“ des mit *SmaI* und *EcoRI* verdauten Plasmides pUC18Not (2,7kb) ligiert. Dieser nun 8,7kb große Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym *NotI* verdaut, in einem Agarosegel das 6,0kb große Fragment mit *cbdABC* vom restlichen Vektor getrennt, das Fragment über ein präparatives Agarosegel isoliert, aufgereinigt und in die *NotI*-Schnittstelle des Minitransposonvektors pUTminiTn5Km2 (7,0kb) ligiert. Dieser nun 13,0kb große Vektor wurde pAL1 genannt und in *E. coli* CC118 λ pir transformiert.

Abbildung 12: pAL1



3.2.5 Konjugationsexperimente

Der Einbau der verschiedenen Genkassetten in das Genom der Rezipientenstämme erfolgte über Transposonmutagenesen, welche analog zu Konjugationen triparental durchgeführt wurden.

Hierzu wurden jeweils der entsprechende Rezipient, der Donor und ein Helferstamm bei der Wachstumstemperatur des Rezipienten zusammen inkubiert und anschließend selektiv ausplattiert.

Gewachsene Klone wurden gepickt und auf entsprechende Eigenschaften untersucht.

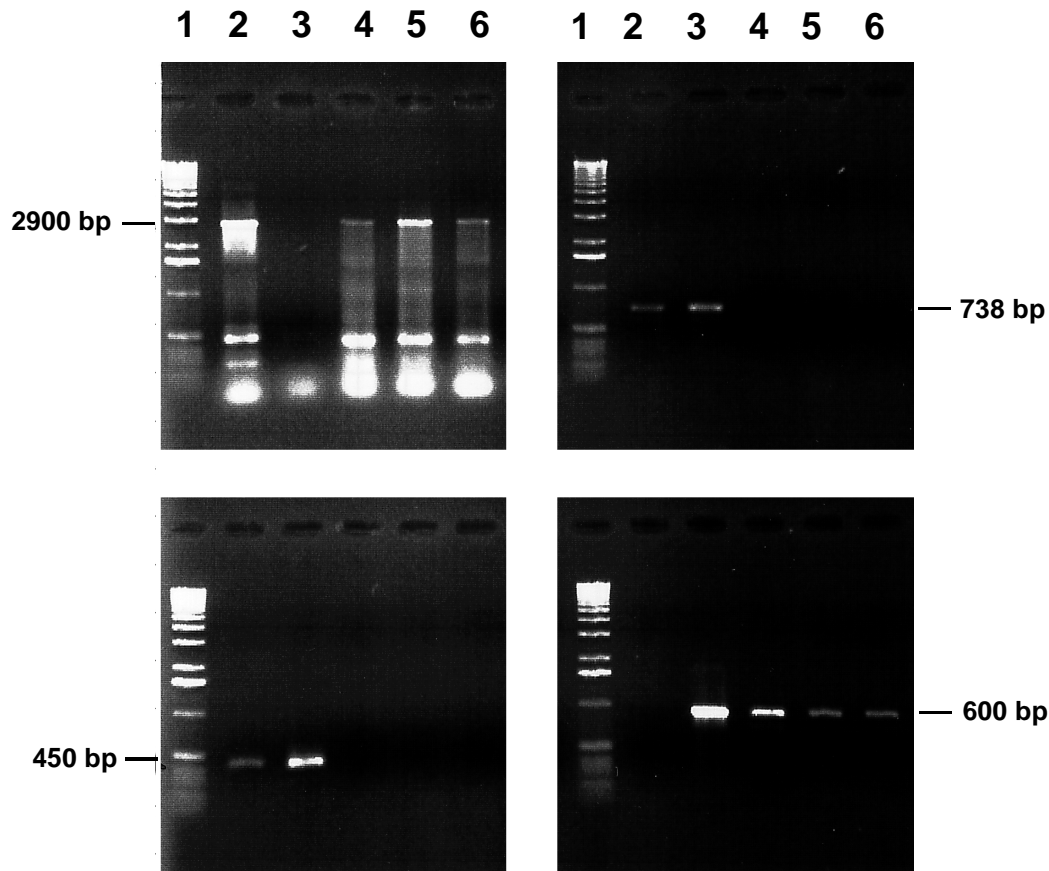
In Tabelle 14 sind alle durchgeführten Konjugationen angegeben.

Tabelle 14: Durchgeführte Konjugationen

	Rezipient	Donor	Helfer	Selektion	Klon
1	<i>Pp</i> F1	pCK05	pRK600	Benzylalkohol-Wachstum Kanamycin-Resistenz	<i>Pp</i> F1*
2	<i>Pp</i> F1*	pJMSB8	pRK600	Benzylalkohol-Wachstum Kanamycin-Sensitivität	<i>Pp</i> F1Δ
3	<i>Pp</i> F1Δ	pBJ4/4	pRK600	3-Chlorbenzoat-Wachstum Kanamycin-Resistenz	<i>Pp</i> F1ΔCC
4	<i>Pp</i> F1ΔCC	pAL1	pRK600	2-Chlorbenzoat-Wachstum Kanamycin-Resistenz	<i>Pp</i> F1AL1
5	<i>B</i> sp. PS12	pCK05	pRK600	Benzylalkohol-Wachstum Kanamycin-Resistenz	<i>B</i> sp. PS12*
6	<i>B</i> sp. PS12*	pKT231cbd	pRK600	2-Chlorbenzoat-Wachstum Kanamycin-Resistenz	<i>B</i> sp. PS12* + pKT231cbd
7	<i>B</i> sp. PS12*	pJMSB8	pRK600	Benzylalkohol-Wachstum Kanamycin-Sensitivität	<i>B</i> sp. PS12Δ
8	<i>B</i> sp. PS12Δ	pKT231cbd	pRK600	2-Chlorbenzoat-Wachstum Kanamycin-Resistenz	<i>B</i> sp. PS12Δ + pKT231cbd
9	<i>B</i> sp. PS12Δ	pAL1	pRK600	2-Chlorbenzoat-Wachstum Kanamycin-Resistenz	<i>B</i> sp. PS12AL1

Jeder Exkonjugant wurde nach erfolgter Konjugation mit Hilfe von PCR auf das Vorhandensein von Plasmiden bzw. auf die Integration der Minitransposonkassette oder integrierten Teilsequenzen der Transposonvektoren getestet.

Eine Integration einer Minitransposonkassette wurde als erfolgreich angesehen, wenn die entsprechende Genkassette aus der genomischen DNA des Stammes mittels PCR amplifiziert werden konnte, aber gleichzeitig eine Amplifikation von Vektor-Sequenzen, wie z.B. des Transposase-Gens oder des Gens für Ampicillin-Resistenz (β-Lactamase-Gen) des Vektors nicht beobachtet werden konnte.

Abbildung 13: Detektion amplifizierter DNA-Sequenzen im Agarosegel

Spur 1: Marker Nr. X von Boehringer

Spur 2: Plasmid DNA pAL1

Spur 3: Plasmid DNA pBJ4/4

Spur 4: genomische DNA des Stammes *Pseudomonas putida* F1AL

Spur 5: genomische DNA des Stammes *Pseudomonas putida* F1AL

Spur 6: genomische DNA des Stammes *Burkholderia* sp. PS12AL

Bild links oben: PCR mit Primern zur Amplifikation eines 2,9kb Fragmentes des 2-Chlorbenzoat Dioxygenase-Gens

Bild rechts oben: PCR mit Primern zur Amplifikation eines 738bp Fragmentes des Transposase-Gens des Minitransposon-Plasmides

Bild links unten: PCR mit Primern zur Amplifikation eines 450bp Fragmentes des β -Lactamase-Gens des Minitransposon-Plasmides

Bild rechts unten: PCR mit Primern zur Amplifikation eines 600bp Fragmentes des Chlorbrenzkatechin 1,2-Dioxygenase-Gens

3.3 Derivate des Stammes *Pseudomonas putida* F1

3.3.1 *Pseudomonas putida* F1*

Zunächst wurde die Minitransposonkassette des Plasmides pCK05 in das Chromosom des Stammes *Pseudomonas putida* F1 integriert. Nach erfolgter Transposition und Selektion wurden mehrere Derivate getestet, von denen der Klon, welcher auf Agarplatten die Kolonie mit dem größten Durchmesser formte, sowie in Flüssigkultur das schnellste Wachstum mit Benzylalkohol in Gegenwart von Kanamycin zeigte, für die weiteren Experimente ausgewählt wurde.

Dieser Klon wird im Weiteren als *Pseudomonas putida* F1* bezeichnet. Zusätzlich zum Wachstum mit Benzylalkohol zeichnet sich dieser Klon durch Wachstum mit *meta*-Xylol aus.

Für alle übrigen getesteten Substrate (siehe Tabelle 15) unterscheidet der Stamm sich nicht im Wachstumsverhalten vom Ausgangsstamm.

Tabelle 15: Wachstum des Stammes *Pseudomonas putida* F1* mit unterschiedlichen Substraten in festen (2mM) und flüssigen Medien (5mM)

Substrat	Agar	Flüssigkultur
Toluol	+	+
Benzylalkohol	+	+
Benzoat	+	+
2-Chlorbenzoat	-	-
3-Chlorbenzoat	-	-
4-Chlorbenzoat	-	-
2-Chlorbenzylalkohol	-	-
3-Chlorbenzylalkohol	-	-
2-Chlortoluol	-	-
3-Chlortoluol	-	-
4-Chlortoluol	-	-
<i>o</i> -Xylol	-	-
<i>m</i> -Xylol	+	+
<i>p</i> -Xylol	-	-
Benzol	+	+
Chlorbenzol	-	-
1,2,4-Trichlorbenzol	-	-
1,2,4,5-Tetrachlorbenzol	-	-

+ Wachstum
- kein Wachstum

Benzylalkohol wird aufgrund der neu integrierten Gene *xy/B* und *xy/C* durch Dehydrogenierung der Alkoholgruppe zu Benzaldehyd und Benzoat oxidiert, welches ein Wachstumssubstrat des Rezipienten darstellt. Für *m*-Xylol kann ein Abbau durch Monooxygenierung einer Methylgruppe gefolgt von Dehydrogenierungen des gebildeten 3-Methylbenzylalkohols über 3-Methylbenzaldehyd zum 3-Methylbenzoat, welches durch diesen Stamm mineralisiert wird, angenommen werden.

Die initiale Monooxygenierung des *meta*-Xylols kann in diesem Konstrukt prinzipiell durch zwei verschiedene Enzyme katalysiert werden, zum einen durch die Xylol Monooxygenase des integrierten oberen Toluol Abbauweges, und zum anderen durch die dem Stamm eigene Toluol Dioxygenase, welche in der Lage ist, solche Monooxygenierungen an Methylgruppen zu katalysieren.

Zur Analyse der Funktion der eingebrachten Abbaugene des oberen Toluol Abbauweges wurden Umsatzversuche mit ruhenden Zellen durchgeführt. Diese Versuche sollten erste Hinweise darauf geben, ob in Toluol verwertenden Zellen der neu integrierte oder der parentale Toluol Abbauweg oder beide induziert sind.

**Tabelle 16: Produkte nach Umsatz verschiedener Substrate durch
Toluol verwertende Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1***

Substrat 300µM	Produkt	Zeit [h]	Konzentration des Produktes [µM]
4-Methyl- benzylalkohol	4-Methylbenzoat	0	<1
		1	116
		4	151
4-Chlor- benzylalkohol	4-Chlorbenzoat	0	<1
		1	66
		4	64
Chlorbenzol	3-Chlorbrenzkatechin	0	32
		1	155
		4	115
2-Chlortoluol	2-Chlorbenzylalkohol	0	67
		1	154
		4	<1
	2-Chlorbenzoat	0	<1
		1	78
		4	227
3-Chlortoluol	3-Chlorbenzylalkohol	0	33
		1	8
		4	<1
	3-Chlorbenzoat	0	<1
		1	251
		4	221

4-Chlortoluol	3-Chlor-6-methylbrenzkatechin	0	19 AE
		1	117 AE
		4	69 AE
	4-Chlorbenzylalkohol	0	<1
		1	<1
		4	<1
<i>o</i>-Xylol	4-Chlorbenzoat	0	<1
		1	<1
		4	<1
	2-Methylbenzylalkohol	0	52
		1	233
		4	12
<i>m</i>-Xylol	2-Methylbenzoat	0	<1
		1	61
		4	190
	3-Methylbenzylalkohol	0	79
		1	79
		4	<1
	3-Methylbenzoat	0	<1
		1	136
		4	17

AE Absorptionseinheiten (x1000)

Im Gegensatz zum Wildtyp konnte beim Umsatz von 3-Chlortoluol keine Akkumulation von 3-Chlorbenzylalkohol beobachtet werden. Es ist von einer schnellen Dehydrogenierung über 3-Chlorbenzaldehyd zum 3-Chlorbenzoat auszugehen. Dieses deutet auf eine Expression von XylB (Benzylalkohol Dehydrogenase) und XylC (Benzaldehyd Dehydrogenase) bei Wachstum mit Toluol hin und somit aufgrund der Lokalisation in einem Operon auf Expression von XylMA (Xylol Monooxygenase). Die initiale Monooxygenierung kann allerdings auch durch die dem Stamm eigene Toluol Dioxygenase katalysiert sein, doch die folgenden Dehydrogenierungen sind den Enzymen des oberen Toluol Abbauweges zuzuordnen.

Der Umsatz von Chlorbenzol zeigt die Induktion der Toluol 2,3-Dioxygenase, welche das Chlorbenzol dioxygeniert. Das Dihydrodiol wird zum „dead-end“ Produkt 3-Chlorbrenzkatechin dehydrogeniert. Weiterhin wurde intermediär eine Dioxygenierung von 4-Chlortoluol durch die Toluol 2,3-Dioxygenase beobachtet. Das 3-Chlor-6-methylbrenzkatechin akkumuliert allerdings im Vergleich zum Elternstamm in geringeren Mengen. Dieses ist möglicherweise durch statistische Schwankungen, unspezifische Reaktionen oder einen langsamen weiteren Metabolismus des 3-Chlor-6-methylbrenzkatechins durch *meta*-Spaltung, katalysiert durch die Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase, welche von dem als Marker in den Stamm integrierten Gen *xyI*E kodiert wird, zurückzuführen. Diesem Phänomen wird im folgenden Abschnitt durch Analyse eines *xyI*E freien Derivates nachgegangen.

Monooxygenierungsprodukte wie 4-Chlorbenzylalkohol oder 4-Chlorbenzoat wurden beim Umsatz von 4-Chlortoluol nicht gebildet. Dies zeigt, daß Toluol verwertende Zellen 4-Chlortoluol bevorzugt durch Dioxygenierung umsetzen.

meta-Xylol wird durch dieses Konstrukt an der Methylgruppe monooxygeniert, wobei sich analog zu 3-Chlortoluol die Frage stellt, ob hierfür die Xylol Monooxygenase oder die Toluol Dioxygenase verantwortlich ist. Der weitere Metabolismus verläuft über Dehydrogenierungen durch die Gene des oberen Toluol Abbaus zum 3-Methylbenzoat, welches weiter zu Intermediaten des Tricarbonsäure-Zyklus mineralisiert wird.

ortho-Xylol, sowie 2-Chlortoluol werden durch die Toluol Dioxygenase an der Methylgruppe monooxygeniert, und über den entsprechenden Benzylalkohol zum korrespondierenden sich akkumulierenden Benzoat dehydrogeniert.

Im Folgenden sollte nach Herausschneiden des Markergens *xyIE* getestet werden, ob sich diese Umsätze analog reproduzieren lassen.

3.3.2 *Pseudomonas putida* F1Δ

Pseudomonas putida F1Δ wurde aus dem Stamm *Pseudomonas putida* F1* entwickelt. Dazu wurden aus dem integrierten Transposon im Genom des Stammes das Kanamycin-Resistenzgen sowie *xyIE*, das Gen für die Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase, als Selektionsmarker herausgeschnitten.

Dieses erfolgte durch ein Konjugationsexperiment zwischen den Stämmen *Pseudomonas putida* F1* und *E. coli* pJMSB8, sowie einem Helferstamm. Die exprimierte Resolvase, welche auf dem transferierten Plasmid pJMSB8 kodiert ist, erkennt die Resolvase-Schnittstellen im Genom des Stammes *Pseudomonas putida* F1* und schneidet die dazwischenliegende Sequenz selektiv heraus. Das Plasmid pJMSB8 ist nicht replizierbar im Rezipienten.

Die Klone wurden mit Benzylalkohol als Wachstumssubstrat angezogen und einzeln auf Kanamycin-Sensitivität getestet. Ein Kanamycin sensibler Klon wurde ausgewählt und als *Pseudomonas putida* F1Δ bezeichnet. Dieser unterscheidet sich von dem Stamm *Pseudomonas putida* F1* nur durch die Deletion der Selektionssequenzen, welche für die Kanamycin-Resistenz und die Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase kodieren.

Das Substratspektrum ist identisch mit dem des Stammes *Pseudomonas putida* F1*.

Das Abbaupotential dieses Stammes wurde anhand des Umsatzes entsprechender Substrate (300μM) durch Toluol verwertende Zellen (OD_{546nm} 10,0) getestet.

**Tabelle 17: Produkte nach Umsatz verschiedener Substrate durch Toluol
verwertende Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1Δ**

Substrat 300μM	Produkt	Zeit [h]	Konzentration des Produktes [μM]
Chlorbenzol	3-Chlorbrenzkatechin	0	19
		1	230
		4	155
2-Chlortoluol	2-Chlorbenzylalkohol	0	21
		1	140
		4	<1
	2-Chlorbenzoat	0	3
		1	144
		4	278
3-Chlortoluol	3-Chlorbenzylalkohol	0	<1
		1	<1
		4	<1
	3-Chlorbenzoat	0	<1
		1	263
		4	170
4-Chlortoluol	3-Chlor-6-methylbrenzkatechin	0	7 AE
		1	249 AE
		4	176 AE
	4-Chlorbenzylalkohol	0	<1
		1	<1
		4	<1
	4-Chlorbenzoat	0	<1
		1	<1
		4	<1
<i>o</i>-Xylol	2-Methylbenzylalkohol	0	44
		1	247
		4	75
	2-Methylbenzoat	0	<1
		1	62
		4	126
<i>m</i>-Xylol	3-Methylbenzylalkohol	0	123
		1	235
		4	<1
	3-Methylbenzoat	0	5
		1	194
		4	<1

AE Absorptionseinheiten (x1000)

Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen, welche bei Umsatz durch den Stamm *Pseudomonas putida* F1* beobachtet wurden. Die Excision der Selektionsmarker hat keinen Einfluß auf die Umsatzfähigkeiten. 3-Chlorbrenzkatechin akkumuliert beim Umsatz von Chlorbenzol sowie 3-Chlor-

6-methylbrenzkatechin beim Umsatz von 4-Chlortoluol in etwas stärkerem Maße als beim Stamm *Pseudomonas putida* F1. Der weitere Umsatz dieser Chlorbrenzkatechine erfolgt aber ähnlich schnell wie im Stamm *Pseudomonas putida* F1*, ist somit nicht durch die Aktivität der Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase (XylE) zu erklären, sondern vermutlich eher durch unspezifische Reaktionen oder statistische Schwankungen.

Obige Versuche deuten darauf hin, daß in Toluol verwertenden Zellen sowohl die Xylol Monooxygenase als auch die Toluol 2,3-Dioxygenase induziert sind. 4-Chlortoluol unterliegt jedoch hauptsächlich einer Dioxygenierung. Hieraus kann vermutet werden, daß höhere Mengen an Dioxygenase und nur geringe Mengen an Monooxygenase induziert sind. Die jeweiligen Induktionslevels sollten zunächst durch die Bestimmung von Sauerstoffaufnahmezeiten analysiert werden.

Dazu wurden die Substrate Toluol, *m*- und *p*-Xylol ausgewählt und zu Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1Δ in einer OD_{546nm} von 1,0 gegeben.

Tabelle 18: Spezifische Sauerstoffaufnahmezeiten bei Inkubation von Toluol verwertenden Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1Δ mit verschiedenen Substraten

Substrat	Sauerstoffaufnahmezeit	
	[μmol O ₂ /min]	%
Toluol	60	100
<i>m</i> -Xylol	21	35
<i>p</i> -Xylol	14	23

Zusätzlich zur Toluol Dioxygenase wird bei Wachstum mit Toluol die Xylol Monooxygenase des oberen Toluol Abbauweges induziert. Aufgrund dieser integrierten Gene, ist eine erhöhte Aktivität im Vergleich zum Ausgangsstamm *Pseudomonas putida* F1 mit *ortho*- und *meta*-Xylol als Substrat erkennbar.

Die genaue Untersuchung der Induktion durch Toluol sollte durch die Quantifizierung verschiedener Enzymaktivitäten des Konstruktes analysiert werden. Hierbei dient eine vorhandene *meta*-Spaltungsaktivität als Indikator für eine Induktion des Dioxygenase Abbauweges, auch eine Aktivität der *cis*-3,5-Cyclohexadien-1,2-diol Dehydrogenase kann einen Hinweis auf einen dioxygenolytischen Abbauweg geben. Die Benzylalkohol und Benzaldehyd Dehydrogenase dienen der Quantifizierung der Induktion des Monooxygenase Abbauweges.

Tabelle 19: Spezifische Aktivitäten verschiedener Enzyme in Toluol verwertenden Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1Δ

Enzym	Substrat in Meßzelle	Aktivität [U/g]
Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase	Brenzkatechin	30
Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase	Brenzkatechin	7
	3-Chlorbrenzkatechin	<1
<i>cis</i> -3,5-Cyclohexadien-1,2-diol Dehydrogenase	<i>cis</i> -3,5-Cyclohexadien-1,2-diol	40
Dienlacton Hydrolase	<i>cis</i> -Dienlacton	<1
Benzylalkohol Dehydrogenase	Benzylalkohol	3
	2-Chlorbenzylalkohol	1
	3-Chlorbenzylalkohol	1
Benzaldehyd Dehydrogenase	Benzaldehyd	4
	2-Chlorbenzaldehyd	<1
	3-Chlorbenzaldehyd	5

Die Enzymtests zeigen, daß in Toluol verwertenden Zellen eine hohe Aktivität der Dihydrodiol Dehydrogenase induziert ist, was auf Induktion des Dioxygenase Abbauweges hindeutet. Die äußerst geringe Aktivität der Benzylalkohol und Benzaldehyd Dehydrogenase zeigt, daß der Monooxygenase Abbauweg in diesen Zellen nur eine untergeordnete Rolle spielt. Weiterhin ist das *meta*-spaltende Enzym Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase induziert.

Für die Konstruktion eines 2- bzw. 3-Chlortoluol abbauenden Stammes sind die oberen Toluol Abbaugene von großer Bedeutung. Wie in den vorausgegangenen Versuchen gezeigt wurde, werden diese bei Wachstum mit Toluol nur schwach bzw. gar nicht induziert. Im Gegensatz zu Toluol, welches sowohl einem dioxygenolytischen als auch einem monooxygenolytischen Umsatz unterliegen kann, kann der Abbau von 2- und 3-Chlortoluol nur über die entsprechenden Benzylalkohole als Zwischenprodukt erfolgen. Diese sind als Induktoren von Enzymen des oberen Toluol Abbauweges beschrieben.

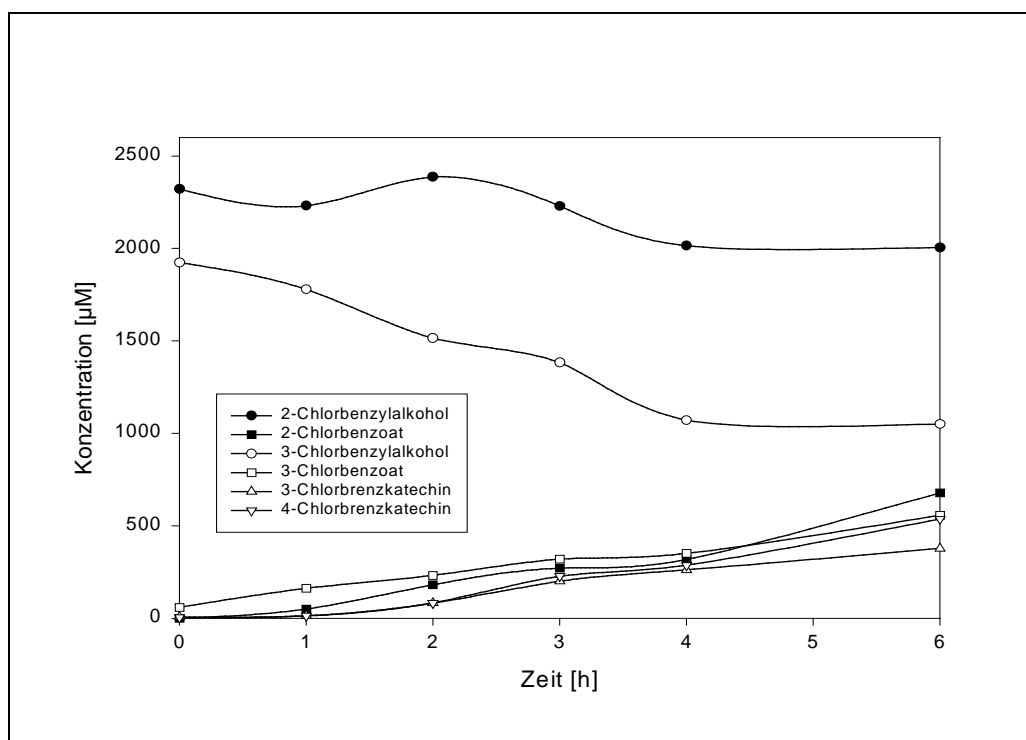
Im folgenden sollte daher getestet werden, in welchem Ausmaß Chlorbenzylalkohole als Induktoren für die Benzylalkohol und Benzaldehyd Dehydrogenase der oberen Toluol Abbaugene fungieren können, womit ebenfalls eine Induktion der Xylol Monooxygenase einhergehen würde.

Dazu wurden Zellen nach Wachstum mit Glukose in einer OD_{546nm} von 1,0 in Puffer mit Salzen aufgenommen und mit Substraten in einer Konzentration von 2,5mM versetzt.

Tabelle 20: Induktion von Glukose verwertenden Zellen des Stammes
Pseudomonas putida F1Δ mit je 2,5mM 2- und 3-Chlorbenzylalkohol

Zeit [h]	Konzentration des Substrates [μM]		Konzentration des Produktes [μM]	
0	2-Chlor- benzylalkohol	2321	2-Chlorbenzoat	<1
1		2231		50
2		2387		181
3		2229		271
4		2015		318
6		2005		678
0	3-Chlor- benzylalkohol	1924	3-Chlorbenzoat	59
1		1779		162
2		1514		232
3		1383		320
4		1071		350
6		1050		557
0			3-Chlor- brenzkatechin	6
1				13
2				82
3				200
4				262
6				378
0			4-Chlor- brenzkatechin	4
1				13
2				83
3				227
4				287
6				537

Abbildung 13: Induktion von Glukose verwertenden Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1Δ mit je 2,5mM 2- und 3-Chlorbenzylalkohol



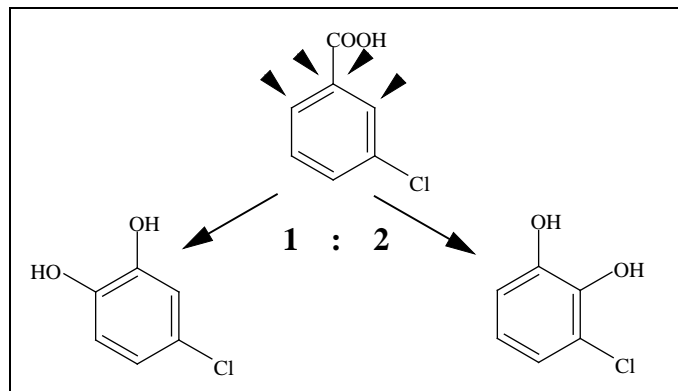
Glukose verwertende Zellen setzen die Substrate 2-Chlor- bzw. 3-Chlorbenzylalkohol zügig mit Raten von ca. 8U/g bzw. 24U/g um. 2-Chlorbenzylalkohol wird zum Endmetaboliten 2-Chlorbenzoat umgesetzt, während das aus 3-Chlorbenzylalkohol gebildete 3-Chlorbenzoat zu Chlorbrenzkatechinen weitermetabolisiert wird.

Da die Umsatzgeschwindigkeit der Chlorbenzylalkohole über den ganzen Versuchszeitraum relativ konstant war, ist davon auszugehen, daß innerhalb dieser Zeit keine signifikante Induktion von Enzymen des oberen Toluol Abbauweges erfolgte. Die beobachteten Raten liegen zudem signifikant unter den in (Chlor)benzylalkohol verwertenden Zellen (siehe Tabelle 30). 3-Chlorbenzoat unterliegt im Versuchszeitraum einem langsamen weiteren Umsatz, ersichtlich an der Akkumulation von Chlorbrenzkatechinen.

Interessanterweise akkumulieren 3-Chlorbrenzkatechin und 4-Chlorbrenzkatechin in annähernd gleichen Mengen. Regioselektivität des Angriffs der Benzoat Dioxygenase an 3-Chlorbenzoat scheint nicht durch die Chloridsubstituenten in Position 3 beeinflusst zu sein. Daß 3-Chlorbenzoat sowohl einer 1,2-Dioxygenierung als auch einer 1,6-Dioxygenierung unterliegt, wurde sowohl von Reineke und Knackmuss für die Benzoat Dioxygenase aus *Pseudomonas* sp. B13 sowie von Pieper et al. für die aus *Ralstonia eutropha* JMP134 beschrieben (Reineke und Knackmuss, 1978; Pieper et al., 1993).

Die beiden Produkte werden laut Literaturangabe in einem Verhältnis von 2:1 (3-Chlorbrenzkatechin : 4-Chlorbrenzkatechin) gebildet, was eine Bevorzugung der Dioxygenierung in 1,2-Position bedeutet.

Abbildung 14: Zwei verschiedene Oxidationsmechanismen bei 3-Chlorbrenzkatechin



(Reineke und Knackmuss, 1978; Pieper et al., 1993)

3.3.3 *Pseudomonas putida* F1ΔCC

Die Integration der Minitransposonkassette des Plasmides pBJ4/4 in den Stamm *Pseudomonas putida* F1Δ mittels Konjugation führte zu Derivaten, welche mit 3-Chlorbenzoat als Substrat und Kanamycin als Selektionsmarker wachsen können. Ein Klon wurde für weitere Experimente ausgewählt und *Pseudomonas putida* F1ΔCC genannt. Dieser unterscheidet sich vom Ausgangsstamm *Pseudomonas putida* F1Δ durch die zusätzlich integrierten Gene *tcbCDEF* sowie das Regulatorgen *tcbR* und Gene für die Kanamycin-Resistenz.

Tabelle 21: Wachstum des Stammes *Pseudomonas putida* F1ΔCC mit unterschiedlichen Substraten in festen (2mM) und flüssigen Medien (5mM)

Substrat	Agar	Flüssigkultur
Toluol	+	+
Benzylalkohol	+	+
Benzoat	+	+
2-Chlorbenzoat	-	-
3-Chlorbenzoat	+	+
4-Chlorbenzoat	-	-
2-Chlorbenzylalkohol	-	-
3-Chlorbenzylalkohol	+	+
2-Chlortoluol	-	-
3-Chlortoluol	+	+
4-Chlortoluol	-	-
<i>o</i> -Xylol	-	-
<i>m</i> -Xylol	+	+
<i>p</i> -Xylol	-	-
Benzol	+	+
Chlorbenzol	+	+
1,2,4-Trichlorbenzol	-	-
1,2,4,5-Tetrachlorbenzol	-	-

+ Wachstum
- kein Wachstum

Für den Abbau von 3-Chlorbenzylalkohol sind die Gene des oberen Toluol Abbauweges Benzylalkohol Dehydrogenase und die Benzaldehyd Dehydrogenase, sowie die Gene für den Chlorbrenzkatechin Abbauweg notwendig. Wachstum dieses Konstruktes mit dem Substrat 3-Chlorbenzylalkohol zeigt somit, daß alle bis dahin eingefügten Gen-Kassetten funktionstüchtig sind. 3-Chlortoluol konnte erst nach einer Adaptationsphase als Wachstumssubstrat in Flüssigkulturen genutzt werden. Worauf diese beruhte, wurde nicht analysiert. Das Wachstum *Pseudomonas putida* F1ΔCC auf Agarplatten mit 3-Chlortoluol als Substrat war jedoch einheitlich. Auch konnten hier keine Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen adaptierter und nicht adaptierter Kultur beobachtet werden.

Auf Agarplatten mit Chlorbenzol als Wachstumssubstrat wurden hingegen sowohl kleine als auch große Kolonien beobachtet. Die Vermutung liegt nahe, daß die Bakterien, welche die größeren Kolonien formten, durch eine spontane Mutation zur Mineralisierung von Chlorbenzol befähigt wurden. Entsprechend formten Bakterien aus Kulturen, die in Flüssigkultur mit Chlorbenzol als Substrat gewachsen waren, auf festem Medium hauptsächlich große Kolonien. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß auch die nicht mutierten Zellen zu einem langsamen Wachstum in Flüssigkultur befähigt sind.

Die weiteren Experimente wurden mit Chlorbenzol verwertenden Mutanten fortgeführt, welche sich ebenfalls auf 3-Chlortoluol als Substrat adaptiert hatten.

Im Vergleich zum vorher analysierten Konstrukt *Pseudomonas putida* F1Δ sollte *Pseudomonas putida* F1ΔCC dazu befähigt sein, die beim Umsatz von Chlorbenzol bzw. 3-Chlortoluol auftretenden Chlorbrenzkatechine weiterzumetabolisieren. Analysiert wurde zunächst der Umsatz durch Toluol verwertende Zellen (OD_{546nm} 10,0) von *Pseudomonas putida* F1ΔCC.

**Tabelle 22: Produkte nach Umsatz verschiedener Substrate durch Toluol
verwertende Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1ΔCC**

Substrat 300μM	Produkt	Zeit [h]	Konzentration des Produktes [μM]
Chlorbenzol	3-Chlorbrenzkatechin	0	77
		1	177
		4	25
2-Chlortoluol	2-Chlorbenzylalkohol	0	19
		1	0
		4	0
	2-Chlorbenzoat	0	0
		1	257
		4	264
3-Chlortoluol	3-Chlorbenzylalkohol	0	13
		1	<1
		4	4
	3-Chlorbenzoat	0	<1
		1	29
		4	<1
4-Chlortoluol	3-Chlor-6-methylbrenzkatechin	0	32 AE
		1	57 AE
		4	<1 AE
	4-Chlorbenzylalkohol	0	<1
		1	<1
		4	<1
	4-Chlorbenzoat	0	<1
		1	<1
		4	<1
<i>o</i>-Xylol	2-Methylbenzylalkohol	0	43
		1	123
		4	<1
	2-Methylbenzoat	0	<1
		1	94
		4	55
<i>m</i>-Xylol	3-Methylbenzylalkohol	0	105
		1	12
		4	<1
	3-Methylbenzoat	0	<1
		1	<1
		4	<1

AE Absorptionseinheiten (x1000)

Der Umsatz von Chlorbenzol führt zu 3-Chlorbrenzkatechin als Zwischenprodukt. Im Gegensatz zu den Derivaten *Pseudomonas putida* F1* und F1Δ akkumuliert 3-Chlorbrenzkatechin jedoch in geringen Mengen und wird vermutlich über spontane Reaktionen hinaus auch weiter umgesetzt. Dieses deutet die Funktion der eingebrachten Chlorbrenzkatechin-Abbaugene an. Entsprechend wurde eine nur geringe Akkumulation von 3-Chlor-6-methylbrenzkatechin aus 4-Chlortoluol beobachtet, welche nicht auf ein Einschleusen des Substrates in den Monooxygenase-Abbauweg zurückzuführen ist, da weder 4-Chlorbenzylalkohol noch 4-Chlorbenzoat akkumuliert. Während, wie erwartet, eine quantitative Akkumulation von 2-Chlorbenzoat aus 2-Chlortoluol beobachtet wurde, häuft sich *meta*-substituiertes Benzoat nur in vergleichsweise geringen Mengen an.

Pseudomonas putida F1ΔCC ist befähigt, 3-Chlortoluol und Chlorbenzol (nach Mutation) als Wachstumssubstrate zu nutzen. Zum Wachstum mit Chlorbenzol ist eine Induktion des dioxygenolytischen Abbauweges notwendig, während zum Abbau von 3-Chlortoluol die Induktion des monooxygenolytischen Abbauweges erforderlich ist, und die Induktion des dioxygenolytischen Segments den Abbau unterstützen könnte.

Mittels Bestimmung der Sauerstoffaufnahme mit unterschiedlichen Substraten durch Chlorbenzol oder 3-Chlortoluol verwertende Zellen sollte analysiert werden, welche initiale Abbauaktivitäten jeweils induziert sind.

Tabelle 23: Spezifische Sauerstoffaufnahme mit Chlorbenzol und 3-Chlortoluol verwertender Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1ΔCC mit verschiedenen Substraten

Anzuchtssubstrat	Chlorbenzol			3-Chlortoluol		
Testsubstrat	[μmol O ₂ /min]	%		[μmol O ₂ /min]	%	
Toluol	44	100	191	72	100	113
Benzol	17	39	74	<1	<1	<1
Chlorbenzol	23	53	100	1	1	2
2-Chlortoluol	2	5	9	3	4	5
3-Chlortoluol	8	18	35	64	89	100
4-Chlortoluol	2	5	9	19	26	41
<i>o</i> -Xylol	2	5	9	1	1	2
<i>m</i> -Xylol	5	11	22	39	54	61
<i>p</i> -Xylol	3	7	13	24	33	38
1,4-Dichlorbenzol	2	5	9	3	4	5

<1 nicht detektierbar

Nach Wachstum mit Chlorbenzol zeigt sich eine Induktion der Toluol Dioxygenase des Stammes. Hohe Aktivitäten sind mit Toluol, Benzol und Chlorbenzol zu verzeichnen. Die gegenüber Toluol verwertenden Zellen des Stammes erhöhten relativen Aktivitäten mit 3-Chlortoluol und *m*-Xylol als Substrat deuten auf eine schwache Induktion der Xylol Monooxygenase hin. Nach Wachstum mit 3-Chlortoluol beobachtet man eine starke Induktion der Xylol Monooxygenase, welche sich an den hohen Aktivitäten mit 3-Chlortoluol, *m*- und *p*-Xylol ausmachen läßt (Substrate, die durch die Dioxygenase nur mit relativ geringer Aktivität umgesetzt werden). Die Toluol Dioxygenase scheint bei Wachstum mit 3-Chlortoluol nicht induziert zu sein, da keine Aktivität mit Chlorbenzol oder Benzol beobachtet wurde. Die hohe Sauerstoffaufnahme mit 4-Chlortoluol ist somit ebenfalls auf die Aktivität der Xylol Monooxygenase zurückzuführen.

Die Sauerstoffaufnahmeleistungen deuten darauf hin, daß in 3-Chlortoluol verwertenden Zellen von den initialen Abbausegmenten nur der obere Toluol Abbaupfad induziert ist, während in Chlorbenzol verwertenden Zellen neben einer hohen Aktivität des dioxygenolytischen Abbausegmentes geringe Aktivität der Xylol Monooxygenase beobachtet werden konnte. Weitere Hinweise auf die jeweils induzierten Abbausegmente sollte die Bestimmung verschiedener Enzymaktivitäten liefern.

**Tabelle 24: Spezifische Aktivitäten verschiedener Enzyme des Stammes
Pseudomonas putida F1ΔCC**

	Anzuchtssubstrat	Toluol	Chlorbenzol
Enzym	Substrat in Meßzelle	Aktivität [U/g]	Aktivität [U/g]
Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase	Brenzkatechin	30	70
Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase	Brenzkatechin	180	220
	3-Methylbrenzkatechin	30	600
	3-Chlorbrenzkatechin	10	480
<i>cis</i> -3,5-Cyclohexadien-1,2-diol Dehydrogenase	<i>cis</i> -3,5-Cyclohexadien-1,2-diol	30	60
Dienlacton Hydrolase	<i>cis</i> -Dienlacton	20	510
Benzaldehyd Dehydrogenase	Benzaldehyd	10	5
	2-Chlorbenzaldehyd	<1	3
	3-Chlorbenzaldehyd	20	5

	Anzuchtssubstrat	3-Chlorbenzoat	3-Chlortoluol
Enzym	Substrat in Meßzelle	Aktivität [U/g]	Aktivität [U/g]
Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase	Brenzkatechin	<1	4
Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase	Brenzkatechin	730	2640
	3-Methylbrenzkatechin	1150	780
	3-Chlorbrenzkatechin	470	880
<i>cis</i> -3,5-Cyclohexadien-1,2-diol Dehydrogenase	<i>cis</i> -3,5-Cyclohexadien-1,2-diol	<1	50
Dienlacton Hydrolase	<i>cis</i> -Dienlacton	1010	1160
Benzaldehyd Dehydrogenase	Benzaldehyd	<1	50
	2-Chlorbenzaldehyd	<1	30
	3-Chlorbenzaldehyd	<1	50

Die nachgewiesene *meta*-Spaltungsaktivität, sowie die Aktivität der *cis*-3,5-Cyclohexadien-1,2-diol Dehydrogenase in Toluol und Chlorbenzol verwertenden Zellen bestätigen die schon durch Messung der Sauerstoffaufnahmezeiten gezeigte Induktion des dioxygenolytischen Abbausegmentes und den damit verbundenen Abbau dieser Substrate durch Dioxygenierung mit anschließender Dehydrogenierung. Während bei 3-Chlortoluol verwertenden Zellen ebenfalls eine Aktivität mit *cis*-3,5-Cyclohexadien-1,2-diol zu erkennen war, konnte keine Induktion des *meta*-Spaltungsweges gezeigt werden. Möglicherweise ist die Aktivität mit *cis*-3,5-Cyclohexadien-1,2-diol nicht auf die entsprechende Dehydrogenase des dioxygenolytischen Abbauweges zurückzuführen, da eine *meta*-Aktivität in diesem Fall aufgrund der Organisation im gleichen Operon ebenfalls angezeigt wäre. Eventuell läßt sich eine solche Aktivität mit *cis*-3,5-Cyclohexadien-1,2-diol auf Kreuzreaktivität eines anderen Enzyms mit diesem Substrat zurückführen. Lee et al. (Lee et al., 1995) beschrieben eine Kreuzreaktivität der *p*-Toluatdihydrodiol Dehydrogenase des TOL Plasmides mit Benzoldihydrodiol, Toluoldihydrodiol und *p*-Xyloldihydrodiol, welche durch Dioxygenierung, katalysiert durch die Toluol 2,3-Dioxygenase, aus Toluol, Benzol bzw. *p*-Xylol entstehen. Eine ähnliche Kreuzreaktivität einer Benzoatdihydrodiol Dehydrogenase des Stammes *Pseudomonas putida* F1 mit *cis*-3,5-Cyclohexadien-1,2-diol wäre denkbar. Allerdings beschrieben Lee et al. (Lee et al., 1995) Brenzkatechin als Reaktionsprodukt aus dem Umsatz aller drei Substanzen (Benzoldihydrodiol, Toluoldihydrodiol und *p*-Xyloldihydrodiol). Die Produktion von ein und dem selben Produkt aus den drei verschiedenen Substraten ist anzuzweifeln.

Keines der drei Anzuchtssubstrate Toluol, Chlorbenzol oder 3-Chlorbenzoat führt zu einer Induktion des eingebrachten Monooxygenase Segmentes, wohingegen 3-Chlortoluol verwertende Zellen signifikante Aktivität des monooxygenolytischen Abbausegmentes aufweisen.

Der *meta*-Weg ist in Toluol und Chlorbenzol verwertenden Zellen induziert. Bei Anzucht mit allen hier getesteten Substraten wurde eine starke Brenzkatechin *ortho*-spaltende Enzymaktivität nachgewiesen. Bei Toluol verwertende Zellen wurde eine solche Aktivität jedoch nur mit Brenzkatechin als Substrat nicht mit dem chlorierten Analogon beobachtet, was auf eine Aktivierung

des 3-Oxadipat-Weges zurückzuführen ist. Die hohe Aktivität in Chlorbenzol, 3-Chlortoluol oder 3-Chlorbenzoat verwertenden Zellen beruht auf der Induktion der integrierten Chlorbrenzkatechin 1,2-Dioxygenase in diesen Stamm, welches sich an der hohen Aktivität mit 3-Chlorbrenzkatechin als Substrat zeigt. Weiterhin weist die hohe Aktivität mit Dienlacton als Substrat auf Funktionstüchtigkeit des gesamten eingeführten Genclusters hin.

3.3.4 *Pseudomonas putida* F1AL

Eine weitere Konjugation führte zur Integration von Genen, welche für eine 2-Chlorbenzoat Dioxygenase kodieren. Diese Gene entstammen dem Minitransposon-Plasmid pAL1 und liegen gekoppelt an eine Kanamycin-Resistenz vor. Dazu wurde das vorherige Konstrukt *Pseudomonas putida* F1ΔCC in einem triparentalen Konjugationsexperiment mit *Escherichia coli* CC118λpir pAL1 und dem Helferstamm *Escherichia coli* pRK600 inkubiert. Die Exkonjuganten wurden mit 2-Chlorbenzoat als Wachstumssubstrat selektioniert, sieben Klone wurden ausgewählt und einer davon als *Pseudomonas putida* F1AL bezeichnet und für die weiteren Experimente verwendet. Dieses Konstrukt enthält alle gewünschten Gensequenzen und wurde daher auf sein Substratspektrum getestet.

Tabelle 25: Wachstum des Stammes *Pseudomonas putida* F1AL mit unterschiedlichen Substraten in festen (2mM) und flüssigen Medien (5mM)

Substrat	Agar	Flüssigkultur
Toluol	+	+
Benzylalkohol	+	+
Benzoat	+	+
2-Chlorbenzoat	+	+
3-Chlorbenzoat	+	+
4-Chlorbenzoat	-	-
2-Chlorbenzylalkohol	+	+
3-Chlorbenzylalkohol	+	+
2-Chlortoluol	-	-
3-Chlortoluol	+	+
4-Chlortoluol	-	-
<i>o</i> -Xylol	-	-
<i>m</i> -Xylol	+	+
<i>p</i> -Xylol	-	-
Benzol	+	+
Chlorbenzol	+	+
1,2,4-Trichlorbenzol	-	-
1,2,4,5-Tetrachlorbenzol	-	-

+ Wachstum
- kein Wachstum

Das Substratspektrum dieses Stammes zeigt im Vergleich zum vorherigen Konstrukt ein Wachstum mit den Substraten 2-Chlorbenzylalkohol und 2-Chlorbenzoat, was die Funktionstüchtigkeit der eingeführten 2-Chlorbenzoat-Kassette bestätigt. Das Wachstum mit 2-Chlorbenzylalkohol und 3-Chlorbenzylalkohol beweist das Vorhandensein und die Aktivität der zuvor integrierten Gensequenzen. Somit kann das Konstrukt als vollständig angesehen werden.

Trotz aller vorhanden benötigten Bausteine, wurde kein Wachstum mit 2-Chlortoluol beobachtet, obwohl 2-Chlorbenzylalkohol verwertet wird, und unter 3.1.4 nachgewiesen wurde, daß 2-Chlortoluol einen Induktor der Toluol 2,3-Dioxygenase darstellt.

Zur Aufklärung des fehlenden Wachstums mit 2-Chlortoluol wurde zunächst die Induktionskapazität verschiedener aromatischer Substrate im Vergleich zum Rezipientenstamm *Pseudomonas putida* F1 analysiert.

Tabelle 26: Spezifische Sauerstoffaufnahme von Glukose (inkl. 0,5mM anderer Substrate) verwertenden Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1AL

Anzuchts- substrat	5mM Glukose	5mM Glukose + 0,5mM Toluol		5mM Glukose + 0,5mM 3- Chlortoluol		5mM Glukose + 0,5mM Chlorbenzol		5mM Glukose + 0,5mM 2- Chlortoluol	
Testsubstrat	[μmol O ₂ /min]	[μmol O ₂ /min]	%	[μmol O ₂ /min]	%	[μmol O ₂ /min]	%	[μmol O ₂ /min]	%
Toluol	<1	19	100	44	100	39	100	13	100
Chlorbenzol	<1	4	21	8	18	6	15	2	15
Glukose	18	-	-	-	-	-	-	-	-

<1 nicht detektierbar

Glukose verwertende Zellen zeigen keine Induktion der Toluol Dioxygenase. Durch Zugabe von 0,5mM der genannten Substrate zum Anzuchtmedium läßt sich eine Induktion hervorrufen. Wie schon in Tabelle 13 für den Rezipientenstamm *Pseudomonas putida* F1 gezeigt, dienen Toluol, Chlorbenzol, 3-Chlortoluol und auch 2-Chlortoluol als Induktoren der Toluol Dioxygenase. Mit weiteren Testsubstraten wie 2-, 3- und 4-Chlortoluol in der Meßzelle ließen sich Aktivitäten von 5-15% derjenigen mit Toluol als Substrat nachweisen.

Nach Wachstum des Stammes *Pseudomonas putida* F1AL mit 5mM Glukose in Anwesenheit von 0,5mM Toluol bzw. 3-Chlortoluol ist eine Induktion der Toluol Dioxygenase gegeben. Ob zusätzlich auch eine Induktion des monooxygenolytischen Abbauweges erfolgt, sollte durch Bestimmung von Enzymaktivitäten analysiert werden.

Tabelle 27: Spezifische Aktivitäten verschiedener Enzyme des Stammes *Pseudomonas putida* F1AL nach Wachstum mit Glukose und Induktoren

	Anzuchtssubstrat	5mM Glukose + 0,5mM Toluol	5mM Glukose + 0,5mM 3-Chlortoluol
Enzym	Substrat in Meßzelle	Aktivität [U/g]	Aktivität [U/g]
Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase	Brenzkatechin	80	120
Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase	Brenzkatechin	<1	<1
	3-Chlorbrenzkatechin	<1	<1
Benzylalkohol Dehydrogenase	Benzylalkohol	<1	<1
	2-Chlorbenzylalkohol	<1	<1
	3-Chlorbenzylalkohol	<1	<1
Benzaldehyd Dehydrogenase	Benzaldehyd	5	10
	2-Chlorbenzaldehyd	<1	<1
	3-Chlorbenzaldehyd	2	<1

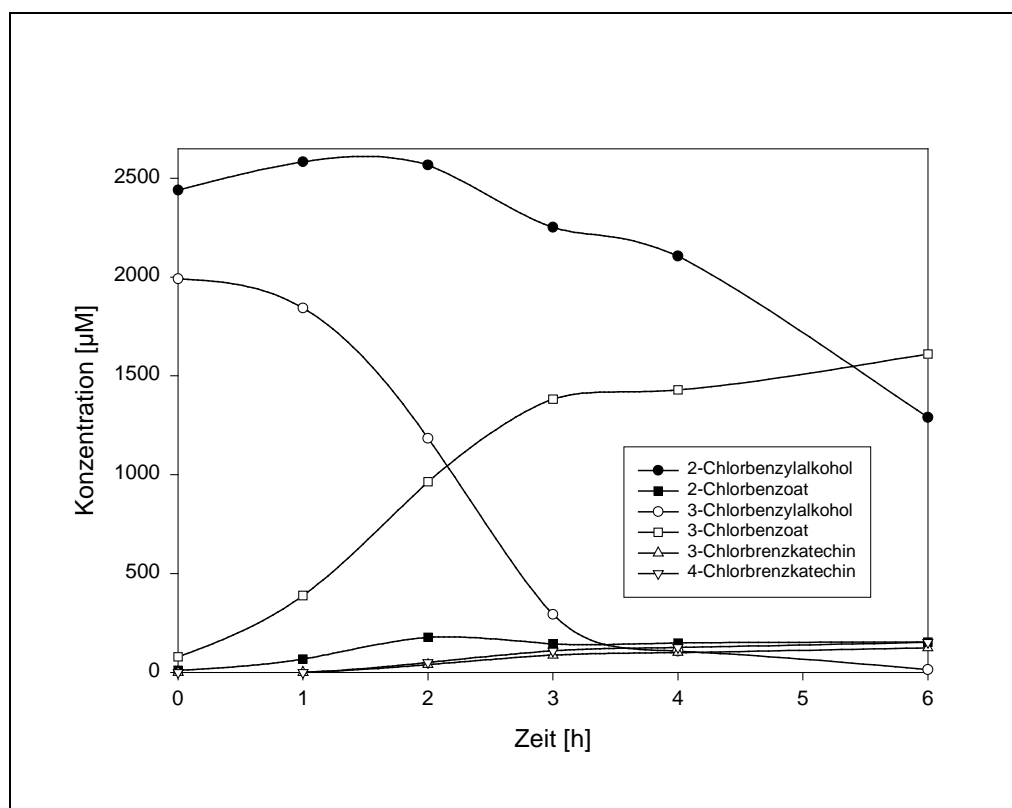
Glukose als Wachstumssubstrat in Kombination mit den induzierenden Substraten Toluol bzw. 3-Chlortoluol bringt Zellen hervor, welche *meta*-, aber keine *ortho*-Aktivität im unteren Abbauweg zeigen. Die Gene, welche für eine *meta*-Spaltung und für die Toluol Dioxygenase kodieren, sind in einem Operon lokalisiert. Bei Induktion der Toluol Dioxygenase kommt es somit gleichzeitig zur Expression des *meta*-spaltenden Abbauweges.

3-Chlortoluol als Induktor der Toluol Dioxygenase konnte in diesem Experiment keine signifikante Induktion des monooxygenolytischen Abbauweges hervorrufen. Für Wachstum mit 3-Chlortoluol sind diese Enzyme jedoch notwendig und müssen daher im Laufe eines Wachstums mit diesem Substrat induziert werden.

Ein weiteres Experiment mit dem Stamm *Pseudomonas putida* F1AL sollte daher zeigen, inwiefern die zwei verschiedenen Chlorbenzylalkohole als Induktoren für die integrierten Enzyme Benzylalkohol und Benzaldehyd Dehydrogenase fungieren können. Zusätzlich stellte sich die Frage, ob das gebildete 2-Chlorbenzoat als Induktor für die integrierte 2-Chlorbenzoat Dioxygenase dient. Glukose verwertende Zellen wurden zu einer OD_{546nm} von 1,0 in Puffer und Salzen resuspendiert und mit Substraten in einer Konzentration von 2,5mM versetzt.

Tabelle 28: Induktion von Glukose verwertenden Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1AL mit je 2,5mM 2- und 3-Chlorbenzylalkohol

Zeit [h]	Konzentration des Substrates [μM]		Konzentration des Produktes [μM]	
0	2-Chlor- benzylalkohol	2440	2-Chlorbenzoat	10
1		2583		67
2		2567		177
3		2252		144
4		2106		149
6		1290		153
0	3-Chlor- benzylalkohol	1991	3-Chlorbenzoat	78
1		1843		389
2		1184		964
3		293		1382
4		107		1429
6		13		1611
0			3-Chlor- brenzkatechin	<1
1				<1
2				39
3				87
4				100
6				124
0			4-Chlor- brenzkatechin	<1
1				<1
2				50
3				109
4				126
6				152

Abbildung 15: Induktion von Glukose verwertenden Zellen des Stammes***Pseudomonas putida* F1AL mit je 2,5mM 2- und 3-Chlorbenzylalkohol**

Wie schon in Tabelle 20 am Konstrukt *Pseudomonas putida* F1Δ gezeigt, werden beide Substrate zügig umgesetzt, wobei auch hier die Umsetzung des in *ortho*-Stellung chlorierten Benzylalkohols langsamer verläuft als die des *meta*-chlorierten Substrates. Für 3-Chlorbenzylalkohol als Substrat läßt sich hier möglicherweise eine Induktion beobachten. Die Umsetzung dieses Substrates verläuft nach einer Stunde Inkubation sehr zügig und etwa doppelt so schnell wie mit 2-Chlorbenzylalkohol als Substrat.

Die Produktion von 2-Chlorbenzoat geht einher mit einem gleichzeitigem Abbau dieses Produktes.

3-Chlorbenzoat reichert sich durch Umsatz von 3-Chlorbenzylalkohol an und wird langsam zu den Chlorbenzocatechinen umgesetzt, welche in geringerem Maße akkumulieren, als es bei *Pseudomonas putida* F1Δ (siehe Tabelle 20) der Fall war, was sich einerseits durch eine niedrigere Benzoat Dioxygenase Aktivität und andererseits durch die in das Konstrukt *Pseudomonas putida* F1AL integrierten Gene für den Abbau von Chlorbenzocatechinen erklären ließe.

Ein erneuter Induktionsansatz mit verschiedenen Substraten in einer geringeren Konzentration nach Anzucht des Stammes mit 5mM Glukose und Versuchsansatz mit einer OD_{546nm} von 1,0 sollte detaillierteren Aufschluß über die Umsetzung geben.

Tabelle 29: Induktion von Glukose verwertenden Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1AL mit je 0,3mM Substrat

Zeit [h]	Substrat-konzentration [μM]	Produktkonzentrationen [μM]			
0	2-Chlorbenzylalkohol	2-Chlorbenzoat			
1	273	18			
3	252	38			
4	150	141			
6	100	185			
6	48	238			
0	3-Chlorbenzylalkohol	3-Chlorbenzoat	3-Chlor-brenzkatechin	4-Chlor-brenzkatechin	
1	136	124	<1	<1	
3	58	212	11	8	
4	<1	208	32	22	
6	<1	202	31	19	
6	<1	192	27	12	
0	2-Chlortoluol	2-Chlor-benzylalkohol	2-Chlorbenzoat		
1	n.b.	<1	<1		
3	n.b.	<1	<1		
4	n.b.	<1	2		
6	n.b.	<1	n.b.		
6	49	<1	7		
0	3-Chlortoluol	3-Chlor-benzylalkohol	3-Chlorbenzoat	3-Chlor-brenzkatechin	4-Chlor-brenzkatechin
1	n.b.	<1	16	<1	<1
3	n.b.	<1	32	<1	<1
4	n.b.	<1	55	1	<1
6	n.b.	<1	55	3	<1
6	<1	<1	51	<1	<1
0	4-Chlortoluol	4-Chlor-benzylalkohol	4-Chlorbenzoat		
1	n.b.	<1	17		
3	n.b.	<1	36		
4	n.b.	<1	82		
6	n.b.	<1	96		
6	n.b.	<1	118		
0	Chlorbenzol	unbek. Produkt			
1	n.b.	<1			
3	n.b.	<1			
4	n.b.	<1			
6	60	5 AE			

n.b. nicht bestimmt
 <1 nicht detektierbar
 AE Absorptionseinheit (x1000)

unbek. Produkt unbekanntes Produkt (Nettoretentionsvolumen 3,6ml bei 50% Methanol im Fließmittel)

2-Chlorbenzylalkohol wird nahezu quantitativ zu 2-Chlorbenzoat umgesetzt, wobei in diesem Experiment der weitere Umsatz nicht eindeutig erkennbar ist. 3-Chlorbenzylalkohol wird schnell zum 3-Chlorbenzoat metabolisiert und dieses langsam zu geringen Mengen an 3-Chlorbrenzkatechin und 4-Chlorbrenzkatechin umgesetzt.

Bei 3-Chlortoluol als Substrat erfolgt eine Mineralisierung über 3-Chlorbenzoat, Chlorbrenzkatechine waren hier nicht nachweisbar. 4-Chlortoluol unterliegt einer Oxidation zum 4-Chlorbenzoat. 3- und 4-Chlortoluol als Substrate konnten zu Ende der Messung nicht mehr detektiert werden, waren somit umgesetzt, nicht komplett aus dem Medium extrahiert oder evaporiert. In Kontrollversuchen mit 300 μ M Substrat in Puffer ohne Zellen zeigte sich, daß eine nahezu eine 100%ige Wiederfindungsrate der Chlortoluole nach 6h Inkubation durch Extraktion möglich ist. Hierbei wurde der Kolben allerdings nicht zwischendurch für Probennahmen geöffnet. Somit kann nur die Evaporation während der Probennahmen als Fehlerquelle angesehen werden. Bei 2-Chlortoluol und Chlorbenzol waren zu Versuchsende noch 49 μ M bzw. 60 μ M Substrat zu bestimmen, über den Verbleib der restlichen Substratmenge kann aufgrund fehlender Produkte (z.B. 2-Chlorbenzoat, 3-Chlorbrenzkatechin) nur angenommen werden, daß sie im Laufe des Experimentes evaporiert ist.

In diesem Experiment zeigte sich eine signifikante Aktivität des monooxygenolytischen Abbauweges, wohingegen keine Aktivität eines dioxygenolytischen Abbauweges nachzuweisen war.

Im Stamm *Pseudomonas putida* F1AL wurden Teile verschiedener Abbauwege zusammengefügt. Schon in *Pseudomonas putida* F1ACC wurde beobachtet, daß ein bestimmtes Substrat verwertende Zellen sich in ihrem Enzymmuster von Zellen, die kurzzeitig mit dieser Verbindung induziert wurden, unterscheiden. Hier sollte nun am Endkonstrukt die jeweils induzierten Abbauwege bei Wachstum mit verschiedenen Substraten charakterisiert werden.

Tabelle 30: Spezifische Aktivitäten verschiedener Enzyme des Stammes *Pseudomonas putida* F1AL

	Anzuchtssubstrat	Toluol	Chlorbenzol	3-Chlor-toluol
Enzym	Substrat in Meßzelle	Aktivität [U/g]	Aktivität [U/g]	Aktivität [U/g]
Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase	Brenzkatechin	60	10	1
Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase	Brenzkatechin	10	100	410
	3-Methylbrenzkatechin	10	n.b.	n.b.
	3-Chlorbrenzkatechin	<1	180	360
<i>cis</i> -3,5-Cyclohexadien-1,2-diol Dehydrogenase	<i>cis</i> -3,5-Cyclohexadien-1,2-diol	50	n.b.	n.b.
Benzylalkohol Dehydrogenase	Benzylalkohol	<1	70	250
	2-Chlorbenzylalkohol	<1	4	10
	3-Chlorbenzylalkohol	1	90	380
Benzaldehyd Dehydrogenase	Benzaldehyd	10	110	250
	2-Chlorbenzaldehyd	<1	3	2
	3-Chlorbenzaldehyd	10	90	190

	Anzuchtssubstrat	Benzoat	2-Chlorbenzoat	2-Chlorbenzylalkohol
Enzym	Substrat in Meßzelle	Aktivität [U/g]	Aktivität [U/g]	Aktivität [U/g]
Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase	Brenzkatechin	4	<1	<1
Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase	Brenzkatechin	230	390	230
	3-Methylbrenzkatechin	n.b.	n.b.	20
	3-Chlorbrenzkatechin	<1	<1	10
<i>cis</i> -3,5-Cyclohexadien-1,2-diol Dehydrogenase	<i>cis</i> -3,5-Cyclohexadien-1,2-diol	n.b.	n.b.	2
Benzylalkohol Dehydrogenase	Benzylalkohol	<1	6	710
	2-Chlorbenzylalkohol	6	4	30
	3-Chlorbenzylalkohol	10	3	860
Benzaldehyd Dehydrogenase	Benzaldehyd	3	30	200
	2-Chlorbenzaldehyd	10	10	20
	3-Chlorbenzaldehyd	<1	<1	310

n.b. nicht bestimmt
<1 nicht detektierbar

In Toluol verwertenden Zellen ist das dioxygenolytische Abbausegment signifikant induziert. Die hohe Aktivität an Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase ist auf Induktion der mit der Toluol 2,3-Dioxygenase und *cis*-3,5-Cyclohexadien-1,2-diol Dehydrogenase in einem Operon lokalisierten *meta*-

spaltenden Enzymaktivität zurückzuführen. Chlorbenzol wird durch diesen Stamm über den dioxygenolytischen Abbauweg mineralisiert, wobei es ebenfalls zu einer Induktion der *meta*-Spaltungsaktivität kommt. Eine entsprechende *meta*-Spaltungsaktivität wurde in 3-Chlortoluol verwertenden Zellen nicht induziert, was ebenfalls daraufhin deutet, daß die Toluol Dioxygenase, welche in einem Operon mit dem Gen für die Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase organisiert ist, nicht induziert wurde. 3-Chlortoluol wird somit wie im Stamm *Pseudomonas putida* F1ΔCC über den monooxygenolytischen Weg metabolisiert. Dieses zeigt sich an Aktivitäten der Benzylalkohol und der Benzaldehyd Dehydrogenase.

Während sowohl 3-Chlortoluol als auch Chlorbenzol verwertende Zellen erwartet hohe Aktivitäten an Chlorbrenzkatechin 1,2-Dioxygenase aufweisen und somit eine Induktion der integrierten Chlorbrenzkatechin-Abbau Genkassette, zeigen 2-Chlorbenzoat und 2-Chlorbenzylalkohol verwertende Zellen nur eine Induktion von Enzymen des 3-Oxadipat Abbauweges, welches zeigt, daß hier der Chlorid-Substituent vor der Ringspaltung durch die 2-Chlorbenzoat Dioxygenase eliminiert wird.

Wie zu erwarten war, zeigten sich nach Wachstum mit 2-Chlorbenzylalkohol signifikante Mengen an Benzylalkohol und Benzaldehyd Dehydrogenase des oberen Toluol Abbauweges. Diese hohen Mengen sind aufgrund der geringen Aktivität dieser Enzyme mit 2-chlorsubstituierten Derivaten für ein Wachstum unabdingbar. Im Vergleich zum unsubstituierten Benzylalkohol bzw. -aldehyd betrugen die Aktivitäten nur ca. 5-10% . Brinkmann und Reineke (Brinkmann und Reineke, 1992) untersuchten ebenfalls die Aktivitäten der Benzylalkohol und der Benzaldehyd Dehydrogenase des TOL Plasmides mit verschiedenen Substraten. Auch sie beschrieben nur eine 10%ige Aktivität der Benzylalkohol Dehydrogenase mit 2-Chlorbenzylalkohol im Vergleich zu Benzylalkohol als Substrat und eine nur 5%ige Aktivität der Benzaldehyd Dehydrogenase mit 2-Chlorbenzaldehyd im Vergleich zu Benzaldehyd als Substrat. Für die *meta*-substituierten Analoge zeigten Brinkmann und Reineke 65% (3-Chlorbenzylalkohol) und 200% (3-Chlorbenzaldehyd) der Aktivität im Vergleich zum unsubstituierten Analogon auf (Brinkmann und Reineke, 1992).

Für den Umsatz der Chlortoluole durch das Endkonstrukt *Pseudomonas putida* F1AL benötigt man eine starke Induktion der Toluol 2,3-Dioxygenase und der Enzyme des monooxygenolytischen Abbauweges, weiterhin speziell für den Umsatz von 3-Chlortoluol eine Induktion der Chlorbrenzkatechin Abbauenzyme. Die drei Anzuchtssubstrate Toluol, Chlorbenzol und 3-Chlortoluol sollten jeweils einige dieser Sequenzen induzieren können. Toluol und Chlorbenzol induzieren verstärkt den dioxygenolytischen Abbauweg, wobei in Chlorbenzol verwertenden Zellen zusätzlich der Chlorbrenzkatechin Abbauweg induziert wird. 3-Chlortoluol verwertende Zellen, welche hier nur mit dem Substrat 2-Chlortoluol getestet wurden, sollten vermehrt den monooxygenolytischen Abbauweg induzieren.

Somit wurden Toluol, Chlorbenzol und 3-Chlortoluol verwertende Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1AL bezüglich der Fähigkeiten zum Umsatz der Chlortoluole untersucht.

Tabelle 31: Produkte nach Umsatz verschiedener Substrate durch den Stamm *Pseudomonas putida* F1AL

Anzuchtssubstrat			Toluol	Chlorbenzol	3-Chlortoluol
Substrat 300µM	Produkt	Zeit [h]	Konzentration des Produktes [µM]	Konzentration des Produktes [µM]	Konzentration des Produktes [µM]
Chlorbenzol	3-Chlorbrenzkatechin	0	9	<1	n.b.
		1	206	<1	n.b.
		2	136	<1	n.b.
		4	31	<1	n.b.
2-Chlortoluol	2-Chlorbenzylalkohol	0	5	27	3
		1	85	94	<1
		2	<1	57	<1
		4	<1	31	<1
	2-Chlorbenzoat	0	<1	<1	7
		1	148	58	170
		2	230	89	142
		4	187	121	126
3-Chlortoluol	3-Chlorbenzylalkohol	0	<1	17	n.b.
		1	<1	<1	n.b.
		2	<1	<1	n.b.
		4	<1	<1	n.b.
	3-Chlorbenzoat	0	12	24	n.b.
		1	197	152	n.b.
		2	73	151	n.b.
		4	10	147	n.b.
	3-Chlorbrenzkatechin	0	4	<1	n.b.
		1	11	<1	n.b.
		2	44	<1	n.b.
		4	32	<1	n.b.
4-Chlortoluol	3-Chlor-6-methylbrenzkatechin	0	<1 Area	<1	n.b.
		1	165 Area	<1	n.b.
		2	311 Area	<1	n.b.
		4	300 Area	<1	n.b.
	4-Chlorbenzylalkohol	0	<1	<1	n.b.
		1	<1	<1	n.b.
		2	<1	<1	n.b.
		4	<1	<1	n.b.
	4-Chlorbenzoat	0	4	<1	n.b.
		1	118	15	n.b.
		2	116	15	n.b.
		4	115	14	n.b.

n.b. nicht bestimmt
<1 nicht detektierbar

Chlorbenzol wird durch Chlorbenzol verwertende Zellen aufgrund der Induktion der Chlorbrenzkatechin Abbauenzyme des Stammes *Pseudomonas putida* F1AL umgesetzt, ohne daß eine Akkumulation von 3-Chlorbrenzkatechin zu verzeichnen ist. Auch Toluol verwertende Zellen zeigen einen schnellen Umsatz von Chlorbenzol, wobei hier 3-Chlorbrenzkatechin zwischenzeitlich angehäuft wird. 3-Chlortoluol wird durch Toluol sowie durch Chlorbenzol verwertende Zellen über 3-Chlorbenzylalkohol, 3-Chlorbenzoat und 3-Chlorbrenzkatechin mineralisiert, wobei wiederum durch Chlorbenzol verwertende Zellen aufgrund der Induktion der Chlorbrenzkatechin Abbaugene kein 3-Chlorbrenzkatechin akkumuliert, jedoch die fehlende Induktion der Benzoat Dioxygenase zur Akkumulation von 3-Chlorbenzoat führt. Bei 2-Chlortoluol als Substrat läßt sich durch Toluol, Chlorbenzol und 3-Chlortoluol verwertende Zellen ein Umsatz über 2-Chlorbenzylalkohol und 2-Chlorbenzoat beobachten. Die stärkste Induktion der Benzylalkohol und Benzaldehyd Dehydrogenase zeigt sich hierbei in 3-Chlortoluol verwertenden Zellen, was sich dadurch äußert, daß keine Akkumulation von 2-Chlorbenzylalkohol zu verzeichnen ist.

4-Chlortoluol wird durch Toluol verwertende Zellen nicht nur dioxygenolytisch zum 3-Chlor-6-methylbrenzkatechin umgesetzt, sondern auch monooxygenolytisch in den unproduktiven Weg zum akkumulierenden 4-Chlorbenzoat. Chlorbenzol verwertende Zellen hingegen zeigen Induktion des dioxygenolytischen Weges und der Chlorbrenzkatechin Abbaugene, so daß ein Abbau von 4-Chlortoluol ohne Akkumulation von Intermediaten über 3-Chlor-6-methylbrenzkatechin anzunehmen ist. Die Akkumulation von 4-Chlorbenzoat und somit ein „Routing“ in den monooxygenolytischen Weg erfolgte nur in untergeordnetem Ausmaß.

In Toluol verwertenden Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1AL ist der dioxygenolytische Abbauweg signifikant induziert. Die Zugabe von 2- bzw. 3-Chlortoluol zu Toluol verwertenden Zellen sollte somit in einem Umsatz zu den entsprechenden Chlorbenzylalkoholen resultieren. Da letztere Wachstumssubstrate darstellen, sollte geprüft werden, ob *Pseudomonas putida* F1AL ein Substratgemisch aus Toluol und 2- bzw. 3-Chlortoluol zu mineralisieren vermag.

Tabelle 32: Wiederfindungsraten nach Wachstum von *Pseudomonas putida* F1AL

Substratzugabe	Substrat- konzentration nach Wachstum (2d) [μM]	Substratwieder- findungsrate [%]		Produkt- konzentration nach Wachstum (2d) [μM]		Produkt- findungsrate [%]
2,5mM Toluol + 2,5mM 2-Chlortoluol	<1 260	Toluol 2CT	<1 10	2CBOH 2CBzt	132 160	5 6
2,5mM Toluol + 2,5mM 3-Chlortoluol	<1 297	Toluol 3CT	<1 12	3CBOH 3CBzt	129 42	5 2

Im Überstand dieser Kulturen konnten nach zwei Tagen Inkubation nur ca. 10% bis 12% der eingesetzten Menge an Chlortoluolen wiedergefunden werden.

11% bzw. 7% der eingesetzten Mengen an 2-Chlortoluol bzw. 3-Chlortoluol wurden als Abbauprodukte wiedergefunden. Da somit insgesamt nur 21% bzw. 19% der eingesetzten Mengen an 2- bzw. 3-Chlortoluol wiedergefunden werden konnten, liegt die Vermutung nahe, daß die restlichen 79% bzw. 81% metabolisiert worden sind. Dies deutet darauf hin, daß neben 3-Chlortoluol auch 2-Chlortoluol durch diesen Stamm abbaubar ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß ein Anteil der flüchtigen Substrate im Laufe der Inkubationsphase bzw. vor Extraktion mit Dichlormethan evaporiert war.

3.3.5 Stabilität

Im Rahmen obiger Untersuchungen zum Abbau von chlorierten Aromaten durch *Pseudomonas putida* F1AL wurde beobachtet, daß Zellen, die längerfristig mit Chlorbenzol oder 3-Chlortoluol als Wachstumssubstrat subkultiviert wurden, die Fähigkeit 2-Chlorbenzoat zu verwerten, verloren hatten. Folglich wurde die Stabilität der 2-Chlorbenzoat Dioxygenase Genkassette in *Pseudomonas putida* F1AL geprüft. Hierzu wurde der Klon *Pseudomonas putida* F1AL nach Wachstum mit 2-Chlorbenzoat über 100 Generationen in LB kultiviert und folgend auf die Fähigkeit, 2-Chlorbenzoat zu verwerten, getestet. Es stellte sich eine Instabilität der Kassette heraus, welche sich dadurch äußerte, daß ein Wachstum mit 2-Chlorbenzoat nicht mehr möglich war. Die Frage, ob diese Instabilität allein auf diesen Klon beschränkt ist, zum Beispiel dadurch, daß die Genkassette mit der 2-Chlorbenzoat Dioxygenase in ein Plasmid im Rezipientenstamm integrierte, sollte durch Stabilitätsanalyse dieser Genkassette in den anderen sechs Klonen, welche in Abschnitt 3.3.4 erwähnt sind, geklärt werden. Somit wurden diese Klone ebenfalls nach über 100 Generationen in LB auf die

Fähigkeit getestet, 2-Chlorbenzoat zu verwerten. Auch bei diesen Konstrukten stellte sich eine Instabilität der 2-Chlorbenzoat Genkassette heraus, welche sich dadurch äußerte, daß einige Klone die Fähigkeit, 2-Chlorbenzoat zu verwerten, völlig verloren hatten, und bei anderen Klonen nur ca. 10% der Zellen Wachstum mit 2-Chlorbenzoat aufwiesen.

Da direkt nach den Konjugationen die Klone auf Transposition der entsprechenden Kassette in das Genom getestet wurden, kann man davon ausgehen, daß diese ordentlich, d.h. ohne Plasmid-Sequenzen integriert vorlagen. Als Ursache für die Instabilität kann das Vorhandensein des Gens für Kanamycin-Resistenz sowohl in dieser Minitransposon-Kassette, welche die Gene für die 2-Chlorbenzoat Dioxygenase enthält, als auch in der Kassette, welche die Gene für den Chlorbrenzkatechin-Abbau beinhaltet, vermutet werden. Im Fall, daß die Instabilität auf entsprechenden Rekombinationsereignissen beruht, sollte auch der integrierte Chlorbrenzkatechin Abbauweg in diesem Stamm instabil sein.

Instabilitäten zeigten sich auch bezüglich der Chlorbrenzkatechin-Abbaugen-Kassette, wenn diese zusammen mit der 2-Chlorbenzoat Dioxygenase-Kassette in einem Stamm vorlagen, wie das bei *Pseudomonas putida* F1AL der Fall ist. Ein Verlust dieser Kassette konnte beobachtet werden, wenn der Stamm mit 2-Chlorbenzoat als Substrat über längere Zeit subkultiviert wurde. Daher wurden die sieben Klone, die ursprünglich sowohl die oberen Toluol Abbaugene, sowie die Chlorbrenzkatechin Abbaugene als auch die 2-Chlorbenzoat Dioxygenase Gene integriert hatten über 100 Generationen in LB kultiviert und anschließend auf die Fähigkeit, 3-Chlorbenzoat zu verwerten, getestet. Auch in diesem Experiment zeigten sämtliche Klone einen Verlust der Eigenschaft, 3-Chlorbenzoat zu verwerten (nur weniger als 10% der Zellen wuchsen noch mit 3-Chlorbenzoat).

Dies läßt auf eine Rekombination der in beiden Kassetten, der 2-Chlorbenzoat Kassette und der Chlorbrenzkatechin Kassette, vorhandenen identischen Kanamycin Resistenzen schließen.

Der Klon *Pseudomonas putida* F1AL, welcher nach Subkultivierung mit 3-Chlortoluol die 2-Chlorbenzoat Dioxygenase-Kassette verloren hatte, wurde *Pseudomonas putida* F1AL Δ genannt und entspricht somit dem zuvor konstruierten Stamm *Pseudomonas putida* F1 Δ CC. Auch dieser Stamm wurde dem Stabilitätstest über 100 Generationen in LB unterzogen, um zu testen, ob eine prinzipielle Instabilität der Chlorbrenzkatechin-Abbau-Kassette vorlag. Da dieser Klon nach 100 Generationen in LB die Fähigkeit, 3-Chlorbenzoat zu verwerten, nicht verloren hatte, kann von einer Stabilität der entsprechenden Kassette ausgegangen werden. Somit bestätigt sich, daß die Instabilität auf ein Rekombinationsereignis zurückzuführen ist.

Für alle durchgeführten Experimente, sowie für die nachfolgend beschriebenen Fermentationen wurde darauf geachtet, daß die Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1AL, welche jeweils zum Beimpfen verwendet wurden, keiner längeren Subkultivierung mit nur einem selektiven Substrat unterlagen, so daß im Impfgut jeweils ausreichend Zellen vorhanden waren, welche die entsprechenden Genkassetten nicht verloren hatten.

3.3.6 2-Chlorbenzoat Dioxygenase-Kassette mit Tellurit-Resistenz

Um letztendlich eine stabile Integration sowohl der Chlorbrenzkatechin Abbaugene als auch der 2-Chlorbenzoat Dioxygenase Genkassette zu erreichen, wurde eine neue 2-Chlorbenzoat Dioxygenase Genkassette hergestellt, in dem aus dem Plasmid pAL1 die Kanamycin-Resistenz herausgeschnitten, und an Stelle dieser eine Tellurit-Resistenz hineinligiert wurde. Hierzu wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym *AvrII* (= *BlnI*) verdaut. Es entstanden zwei Produkte, von denen das eine das Gen für die Kanamycin-Resistenz und das andere das restliche Plasmid inklusive der 2-Chlorbenzoat Dioxygenase Kassette darstellte. Ein Gen, welches für eine Tellurit-Resistenz kodiert, wurde mit dem gleichen Restriktionsenzym aus einem anderen Minitransposonplasmid (pSPM100) (Panke, 1995) mit dieser Resistenz herausgeschnitten. Dieses Fragment wurde in das geschnittene Plasmid mit der 2-Chlorbenzoat Dioxygenase Kassette ligiert, und das Ligationsprodukt in *Escherichia coli* CC118 λ pir transformiert. Der mit Tellurit selektionierte *Escherichia coli* Klon wurde *Escherichia coli* CC118 λ pir pALTel genannt und kann für Minitransposon-Integration der 2-Chlorbenzoat Dioxygenase Kassette mit Tellurit-Resistenz verwendet werden.

Eine solche Kassette sollte über Transposition zufällig in das Genom integrieren und nicht durch Rekombination der Gene für Kanamycin-Resistenz zweier verschiedener Kassetten in das Genom gelangen. Entsprechende Derivate wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht hergestellt.

3.3.7 Fermentation

Die Fermentation im Chemostaten dient zur kontinuierlichen Kultivierung von Bakterien und zur Aufrechterhaltung konstanter Bedingungen.

Diese Fermentierungen im Chemostaten dienen dazu, zu untersuchen, ob *Pseudomonas putida* F1AL unter geeigneten Bedingungen in kontinuierlicher Kultur zur Nutzung von 2-Chlortoluol als Wachstumssubstrat befähigt ist. Es wurden zwei verschiedene Ansätze durchgeführt.

3.3.7.1 Fermentation Nr. 1

Das Arbeitsvolumen von 1l wurde mit 1ml einer Toluol verwertenden Vorkultur des Stammes *Pseudomonas putida* F1AL beimpft. Die Fermentation wurde bei 30°C, 300rpm, einem pH von 7,2 und einer Durchflußgeschwindigkeit des Mediums von 15ml/h durchgeführt. Das Wachstumssubstrat Toluol wurde über den Luftstrom in das Medium eingeblasen.

Nach 24h waren die Bakterien auf eine OD_{546nm} von 1,5 angewachsen. Nachdem die OD über drei Tage konstant blieb, wurde die Zufuhr von 3-Chlortoluol als zweites Substrat mit dem Luftstrom

gestartet und 24h lang beide Substrate zugeführt. Eine Braunfärbung des Mediums deutete den Umsatz von 3-Chlortoluol und die Akkumulation chlosubstituierter Brenzkatechine an. Diese Akkumulation kann zum einen ihre Ursache in einer unzureichenden Induktion der integrierten Chlorbrenzkatechin-Genkassette haben, ist aber höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß während des initialen Wachstums mit Toluol ein Großteil der Zellen die Chlorbrenzkatechin-Abbau Genkassette verloren hatte. Um diejenigen Zellen zu selektionieren, die noch über eine integrierte Chlorbrenzkatechin-Abbau Genkassette verfügen, wurde die Toluol Zufuhr zu diesem Zeitpunkt abgestellt und nur noch mit 3-Chlortoluol begast. Ein Abfall der optischen Dichte bei $\lambda = 546\text{nm}$ bis zu einem Wert von 0,05 in 7 Tagen und eine intensivere Braunfärbung der Kultur waren die Folge.

Um toxische Effekte des 3-Chlortoluols zu vermindern wurde die 3-Chlortoluol Zufuhr auf ein Minimum reduziert. Die Kultur erholte sich und ein Anstieg der $\text{OD}_{546\text{nm}}$ bis zu 0,58 sowie ein Verschwinden der Braunfärbung durch Adaptation an 3-Chlortoluol als Substrat waren zu verzeichnen. Dies läßt sich durch ein Wachstum von Zellen erklären, welche die Genkassette zum Chlorbrenzkatechin-Abbau noch nicht verloren hatten.

Nachdem die $\text{OD}_{546\text{nm}}$ für 24h konstant blieb, wurde als weiteres Substrat 2-Chlortoluol in geringen Mengen über den Luftstrom eingeblasen. Die zusätzliche Substratzugabe bewirkte jedoch keinen Anstieg der $\text{OD}_{546\text{nm}}$. Im Gegensatz war eine kontinuierliche Abnahme der $\text{OD}_{546\text{nm}}$ (0,1/24h) zu beobachten, bis zu einem Wert von 0,2. Es ist zu vermuten, daß die zuvor gewachsenen Zellen, welche noch die integrierte Chlorbrenzkatechin Kassette besaßen, kein 2-Chlorbenzoat, aufgrund des Verlustes der entsprechenden Kassette, verwerten können. Von einer gezogenen Probe (bei einer $\text{OD}_{546\text{nm}}$ von 0,3) wurde der Überstand mittels analytischer HPLC untersucht. Es konnte 2-Chlorbenzoat (30 μM), 3-Chlorbenzoat (10 μM) sowie Chlorbrenzkatechine in geringeren Mengen nachgewiesen werden. Die Akkumulation des 2-Chlorbenzoats kann ein Zeichen dafür sein, daß der Stamm die 2-Chlorbenzoat Dioxygenase nicht exprierte oder die integrierten Gene verloren hatte. Da somit kein Umsatz von 2-Chlorbenzoat zu verzeichnen war, wurde die Fermentation an dieser Stelle abgebrochen.

3.3.7.2 Fermentation Nr. 2

In einer erneuten Fermentation sollte dem Verlust der Gene, welche für die 2-Chlorbenzoat Dioxygenase kodieren, vorgebeugt werden, indem 2-Chlorbenzoat (2mM) mit dem Puffer kontinuierlich in den Chemostaten eingepumpt wurde. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität der Chlorbrenzkatechin Abbaugene sowie zur Induktion der Toluol Dioxygenase, welche den ersten entscheidenden Schritt im Abbau von 2-Chlortoluol katalysiert, wurde Chlorbenzol als zweites Wachstumssubstrat gewählt.

Das Arbeitsvolumen betrug wie beim ersten Ansatz 1l und wurde mit 1ml einer 2-Chlorbenzoat verwertenden Vorkultur des Stammes *Pseudomonas putida* F1AL beimpft. Die Fermentation wurde

bei 30°C, 300rpm, einem pH von 7,2 und einer Durchflußgeschwindigkeit des Mediums von 15ml/h durchgeführt.

Im Unterschied zum ersten Ansatz enthielt das Medium zusätzlich 2mM 2-Chlorbenzoat und an Stelle von 3-Chlortoluol wurde Chlorbenzol über den Luftstrom eingeblasen.

Die optischen Dichte (OD_{546nm}) stabilisierte sich bei 0,92. Nach 48h wurde 2-Chlortoluol als zusätzliches Substrat zugeführt. Dies führte zu einer langsamen Abnahme der OD_{546nm} . Im Überstand konnten bis zu 1800µM Muconolacton, 245µM 2-Chlormuconsäure, sowie geringe Mengen an 3-Chlorbrenzkatechin (10µM) und 2-Chlorbenzoat (25µM) mittels HPLC Analytik nachgewiesen werden. Diese Intermediate deuten auf einen Umsatz von Chlorbenzol sowie von 2-Chlorbenzoat hin. Nachdem die OD_{546nm} auf 0,2 abgesunken war, wurde die 2-Chlortoluol Zufuhr reduziert und die Chlorbenzol Zufuhr erhöht. Dies ergab einen Anstieg der OD_{546nm} innerhalb von 24h auf 1,5. Eine anschließende Erhöhung der 2-Chlortoluol Zufuhr führte zu einem Abfall der OD_{546nm} auf 0,5. Der Kulturüberstand enthielt zu diesem Zeitpunkt 200-300µM Muconolacton, 5µM 2-Chlormuconsäure und 2µM 3-Chlorbrenzkatechin. Dies deutet wiederum nicht auf einen Umsatz des zugeführten 2-Chlortoluols hin. Nach Konstanz dieser OD_{546nm} von 0,5 über eine Woche führte ein Abstellen der Chlorbenzol Zufuhr zu einer Abnahme der OD_{546nm} auf einen Wert von 0,24, ein weiteres Abstellen der 2-Chlorbenzoat Zufuhr ließ die Kultur im Fermenter mit nur 2-Chlortoluol als Substrat absterben. Ein Wachstum mit 2-Chlortoluol als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle konnte somit nicht erreicht werden.

3.4 Derivate des Stammes *Burkholderia* sp. PS12

3.4.1 *Burkholderia* sp. PS12*

Burkholderia sp. PS12* entstand durch Integration der Minitransposonkassette des Plasmides pCK05 in den Stamm *Burkholderia* sp. PS12 mittels Konjugation. Hierzu wurden die Exkonjuganten mit Benzylalkohol als Wachstumssubstrat und Kanamycin als Resistenzmarker selektioniert, ein Klon ausgewählt und als *Burkholderia* sp. PS12* bezeichnet. Dieser Stamm verfügt über die Abbaugene des oberen Toluol Abbaus, sowie über die zusätzlichen Selektionssequenzen (Kanamycin-Resistenz und *xylE*).

Tabelle 33: Wachstum des Stammes *Burkholderia* sp. PS12* mit unterschiedlichen Substraten in festen (2mM) und flüssigen Medien (5mM)

Substrat	Agar	Flüssigkultur
Toluol	+	+
Benzylalkohol	+	+
Benzoat	+	+
2-Chlorbenzoat	-	-
3-Chlorbenzoat	+	+
4-Chlorbenzoat	-	-
2-Chlorbenzylalkohol	-	-
3-Chlorbenzylalkohol	+	+
2-Chlortoluol	-	-
3-Chlortoluol	-	-
4-Chlortoluol	+	+
<i>o</i> -Xylol	-	-
<i>m</i> -Xylol	-	-
<i>p</i> -Xylol	-	-
Benzol	+	+
Chlorbenzol	+	+
1,2,4-Trichlorbenzol	+	+
1,2,4,5-Tetrachlorbenzol	+	+

+ Wachstum
- kein Wachstum

Die Fähigkeit dieses Konstruktes, mit Benzylalkohol und 3-Chlorbenzylalkohol zu wachsen, zeigt die erfolgreiche Integration der oberen Toluol Abbaugene. Diese Gene sind in einem Operon organisiert, so daß von einer koordinierten Expression, also auch der Xylol Monooxygenase ausgegangen werden kann. Ein Wachstum mit 3-Chlortoluol konnte jedoch nicht beobachtet werden. Hierbei ist anzumerken, daß sich Wachstum dieses Stammes besonders mit Substraten, welche über die Gasphase zugeführt wurden, als schwierig erwies.

Tabelle 34: Spezifische Aktivitäten verschiedener Enzyme des Stammes *Burkholderia* sp. PS12*

	Anzuchtssubstrat	3-Chlor-benzoat	Benzyl-alkohol
Enzym	Substrat in Meßzelle	Aktivität [U/g]	Aktivität [U/g]
Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase	Brenzkatechin	<1	300
Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase	Brenzkatechin	50	210
	3-Chlorbrenzkatechin	50	6
Benzylalkohol Dehydrogenase	Benzylalkohol	<1	190
	2-Chlorbenzylalkohol	<1	10
	3-Chlorbenzylalkohol	<1	360
Benzaldehyd Dehydrogenase	Benzaldehyd	6	100
	2-Chlorbenzaldehyd	<1	20
	3-Chlorbenzaldehyd	<1	70

Wachstum mit 3-Chlorbenzoat erfolgt wie im Wildtyp über Chlorbrenzkatechine als Intermediate und folgende *ortho*-Spaltung, wie aus der Aktivität der Chlorbrenzkatechin 1,2-Dioxygenase ersichtlich ist. Bei Wachstum mit Benzylalkohol sind, wie erwartet, hohe Aktivitäten der Benzylalkohol und Benzaldehyd Dehydrogenase des neu integrierten oberen Toluol Abbauweges des TOL Plasmides nachweisbar. Intermediäres Brenzkatechin kann, aufgrund hoher Aktivitäten der Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase als auch der Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase, sowohl über den *meta*-spaltenden als auch den 3-Oxadipat-Weg abgebaut werden.

Ob es sich bei dieser *meta*-spaltenden Enzymaktivität um Enzyme des Stammes *Burkholderia* sp. PS12 handelt, oder um die durch die Transposonintegration eingebrachte Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase (*xyIE*), kann erst nach Herausschneiden dieser Selektionsmarker aus dem Konstrukt gesagt werden.

3.4.2 *Burkholderia* sp. PS12* + pKT231cbd

Für erste Tests zum Wachstumsverhalten des Stammes *Burkholderia* sp. PS12, welcher sowohl die oberen Toluol Abbaugene als auch die 2-Chlorbenzoat Dioxygenase enthält, wurde das Plasmid mit den Genen für die 2-Chlorbenzoat Dioxygenase, pKT231cbd, in den Stamm *Burkholderia* sp. PS12* konjugiert.

Derivate, welche das Plasmid enthielten, wurden mit 2-Chlorbenzoat als Substrat selektioniert. Eines dieser Derivate wurde als *Burkholderia* sp. PS12*+pKT231cbd bezeichnet und für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Zellen, welche mit 2-Chlorbenzoat bzw. mit Benzylalkohol gezogen wurden, sollten auf Sauerstoffaufnahme bei Umsatz verschiedener Substrate getestet werden.

Tabelle 35: Spezifische Sauerstoffaufnahme bei Inkubation von Zellen des Stammes *Burkholderia* sp. PS12* + pKT231cbd mit verschiedenen Substraten

Anzuchtssubstrat	2-Chlorbenzoat		Benzylalkohol	
Testsubstrat	[$\mu\text{mol O}_2/\text{min}$]	%	[$\mu\text{mol O}_2/\text{min}$]	%
2-Chlorbenzoat	36	100	<1	<1
3-Chlorbenzoat	10	28	1	6
4-Chlorbenzoat	<1	<1	2	12
2-Chlorbenzylalkohol	<1	<1	<1	<1
3-Chlorbenzylalkohol	3	8	<1	<1
4-Chlorbenzylalkohol	<1	<1	<1	<1
2-Chlortoluol	1	3	<1	<1
3-Chlortoluol	<1	<1	<1	<1
4-Chlortoluol	1	3	<1	<1
Benzaldehyd	n.b.	n.b.	5	29
Benzylalkohol	n.b.	n.b.	17	100
Toluol	<1	<1	<1	<1

n.b. nicht bestimmt
<1 nicht detektierbar

Wachstum dieses Stammes mit 2-Chlorbenzoat induziert, wie schon für *Pseudomonas putida* F1 und Derivate nachgewiesen, nur die für den Abbau von 2-Chlorbenzoat notwendige Enzymatik, jedoch keines der Enzyme zum Umsatz von Toluol und den substituierten Derivaten. Folglich wurde eine erhöhte Sauerstoffaufnahme nur mit 2- und 3-Chlorbenzoat beobachtet.

Benzylalkohol verwertende Zellen zeigen eine hohe Sauerstoffaufnahme mit Benzylalkohol und mit Benzaldehyd. Mit chloresubstituierten Benzylalkoholen waren jedoch, trotz der berichteten hohen Aktivitäten der Dehydrogenasen mit 3- und 4-Chlorbenzylalkohol keine erhöhten Sauerstoffaufnahme nachweisbar. Dieses ist für 4-Chlorbenzylalkohol erklärbar dadurch, daß der Stamm *Burkholderia* sp. PS12 4-Chlorbenzoat nicht verwerten kann und der anzunehmende Umsatz von 4-Chlorbenzylalkohol zu 4-Chlorbenzoat keine Sauerstoff verbrauchende Reaktion beinhaltet. Entsprechend sollte sich bei 3-Chlorbenzylalkohol als Substrat die Sauerstoffaufnahme nur gering erhöhen (wie bei 3-Chlorbenzoat als Substrat), da unter der Annahme, daß Benzylalkohol die Chlorbrenzkatechin spaltenden Enzyme nicht induziert, der Umsatz von 3-Chlorbenzoat die einzige Sauerstoff verbrauchende Reaktion darstellt. Aktivitäten mit 3- und 4-Chlortoluol und insbesondere Toluol waren zu erwarten, da mit Induktion der integrierten oberen Toluol Abbaugene Benzylalkohol Dehydrogenase und Benzaldehyd Dehydrogenase die Xylol Monooxygenase des oberen Toluol

Abbauweges ebenfalls induziert werden sollte. Entsprechende Aktivitäten konnten jedoch nicht nachgewiesen werden.

Im Folgenden wurden die Aktivitäten verschiedener Schlüsselenzyme nach Wachstum mit den Substraten Benzylalkohol, 2-Chlorbenzylalkohol und 2-Chlorbenzoat analysiert.

Tabelle 36: Spezifische Aktivitäten verschiedener Enzyme des Stammes *Burkholderia* sp. PS12* + pKT231cbd

	Anzuchtssubstrat	Benzyl- alkohol	2-Chlor- benzyl- alkohol	2-Chlor- benzoat
Enzym	Substrat in Meßzelle	Aktivität [U/g]	Aktivität [U/g]	Aktivität [U/g]
Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase	Brenzkatechin	100	60	80
Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase	Brenzkatechin	190	820	510
	3-Chlorbrenzkatechin	3	1	1
Benzylalkohol Dehydrogenase	Benzylalkohol	110	1730	<1
	2-Chlorbenzylalkohol	6	60	<1
	3-Chlorbenzylalkohol	210	2300	<1
Benzaldehyd Dehydrogenase	Benzaldehyd	110	270	50
	2-Chlorbenzaldehyd	<1	20	<1
	3-Chlorbenzaldehyd	70	710	20

Wie zu erwarten war, zeigten sich nach Wachstum mit Benzylalkohol und 2-Chlorbenzylalkohol signifikante Aktivitäten der Benzylalkohol und Benzaldehyd Dehydrogenase des oberen Toluol Abbauweges, welche aufgrund der geringen Aktivität dieser Enzyme mit 2-chlorsubstituierten Derivaten für ein Wachstum unabdingbar sind. Die Aktivitäten bezüglich der in *ortho*-Stellung chlorierten Benzylalkohole und -aldehyde, sind wie auch von Brinkmann und Reineke (Brinkmann und Reineke, 1992) beschrieben und für *Pseudomonas putida* F1AL schon erläutert, sehr niedrig.

2-Chlorbenzoat induziert die Enzyme des oberen Toluol Abbauweges nicht.

Nach Wachstum mit allen hier getesteten Substraten wurden hohe Aktivitäten der Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase mit unchloriertem Brenzkatechin, aber auch signifikante Aktivitäten für das *meta*-Spaltungsenzym Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase gemessen, wobei wiederum nicht auszuschließen ist, daß es sich hierbei um Aktivitäten des Produktes von *xyIE* handelt, welches als Selektionsmarker integriert worden war.

3.4.3 *Burkholderia* sp. PS12Δ

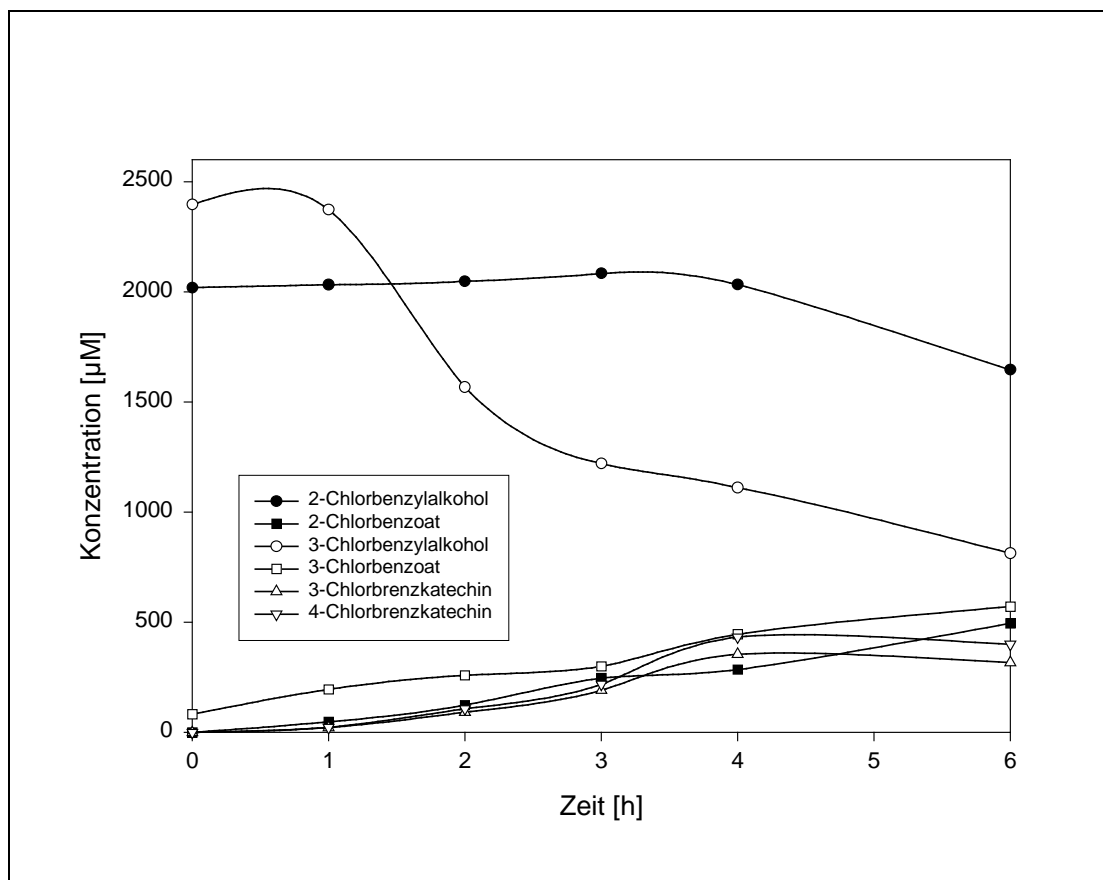
Der Stamm *Burkholderia* sp. PS12Δ wurde durch Deletion der integrierten Selektionssequenzen *xyIE* und des Kanamycin Resistenzgens (wie in Abschnitt 3.3.2 für *Pseudomonas putida* F1Δ beschrieben) aus dem Stamm *Burkholderia* sp. PS12* gewonnen. Die Klone wurden mit Benzylalkohol als Wachstumssubstrat angezogen und einzeln auf Kanamycin-Sensitivität getestet. Ein Kanamycin sensibler Klon wurde ausgewählt und als *Burkholderia* sp. PS12Δ bezeichnet.

Auch dieser Stamm sollte auf das Induktionspotential durch 2- bzw. 3-Chlorbenzylalkohol getestet werden. Daher wurden Zellen mit Puffer und Salzen auf eine OD_{546nm} von 1,0 eingestellt, mit 300μM Substrat versetzt, und über sechs Stunden auf Produktbildung untersucht.

Tabelle 37: Induktion von Glukose verwertenden Zellen des Stammes *Burkholderia* sp. PS12Δ mit je 2,5mM 2- und 3-Chlorbenzylalkohol

Zeit [h]	Konzentration des Substrates [μM]		Konzentration des Produktes [μM]	
0	2-Chlor- benzylalkohol	2019	2-Chlorbenzoat	<1
1		2032		48
2		2048		124
3		2083		246
4		2033		285
6		1646		495
0	3-Chlor- benzylalkohol	2396	3-Chlorbenzoat	82
1		2373		195
2		1567		259
3		1221		300
4		1111		445
6		813		571
0			3-Chlor- brenzkatechin	<1
1				22
2				92
3				191
4				355
6				317
0			4-Chlor- brenzkatechin	<1
1				23
2				107
3				218
4				433
6				400

Abbildung 16: Induktion von Glukose verwertenden Zellen des Stammes *Burkholderia* sp. PS12 Δ mit je 2,5mM 2- und 3-Chlorbenzylalkohol



Der Umsatz von 3-Chlorbenzylalkohol zu 3-Chlorbenzoat verläuft, wie auch schon im Stamm *Pseudomonas putida* F1 Δ CC beobachtet, schneller als der Umsatz von 2-Chlorbenzylalkohol zu 2-Chlorbenzoat. Hier ist möglicherweise ebenfalls von einer Induktion der Benzylalkohol Dehydrogenase durch 3-Chlorbenzylalkohol auszugehen.

Wie bei *Pseudomonas putida* F1 Δ CC treten auch in diesem Fall beim Abbau von 3-Chlorbenzoat zwei verschiedene Chlorbrenzkatechine als Produkte auf, 3-Chlorbrenzkatechin und 4-Chlorbrenzkatechin, welche in annähernd gleichen Mengen produziert werden.

Burkholderia sp. PS12 Δ unterscheidet sich von *Burkholderia* sp. PS12* nur durch Deletion der Selektionssequenz *xyIE*, sowie des Kanamycin Resistenzgens, und wurde daher bezüglich der *meta*-spaltenden Aktivität untersucht. Wachstum mit Toluol sollte zeigen, ob der Stamm dieses Substrat durch *meta*- oder *ortho*-Spaltung im unteren Abbauweg metabolisiert, sowie welcher Weg im oberen Abbau gewählt wird.

Tabelle 38: Spezifische Aktivitäten verschiedener Enzyme des Stammes *Burkholderia* sp. PS12Δ

	Anzuchtssubstrat	Benzyl- alkohol	Toluol
Enzym	Substrat in Meßzelle	Aktivität [U/g]	Aktivität [U/g]
Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase	Brenzkatechin	50	50
Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase	Brenzkatechin	410	<1
	3-Methylbrenzkatechin	300	5
	3-Chlorbrenzkatechin	0	10
<i>cis</i> -3,5-Cyclohexadien-1,2-diol Dehydrogenase	<i>cis</i> -3,5-Cyclohexadien-1,2-diol	30	50
Dienlacton Hydrolase	<i>cis</i> -Dienlacton	<1	10
Benzaldehyd Dehydrogenase	Benzaldehyd	100	3
	2-Chlorbenzaldehyd	6	<1
	3-Chlorbenzaldehyd	120	20

Das Konstrukt *Burkholderia* sp. PS12Δ zeigt nach Wachstum mit Toluol einen Abbau über eine initiale Dioxygenierung, d.h. durch die Tetrachlorbenzol Dioxygenase, und nicht über die Enzyme des eingefügten oberen Toluol Abbauweges. Diese Werte sind ähnlich denen, welches für den Ausgangsstamm *Burkholderia* sp. PS12 bestimmt wurden. Der weitere Abbau erfolgt über eine *meta*-Spaltung, und nicht durch *ortho*-Spaltung, für welche dieser Stamm ebenfalls Enzyme besitzt. Bei Benzylalkohol verwertenden Zellen zeigt sich ebenfalls eine Induktion des *meta*-Weges, aber zusätzlich eine weitaus signifikantere Aktivität des *ortho*-spaltenden Enzyms Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase. Neben einer Induktion der initialen Dioxygenase beobachtet man die zu erwartende Aktivität der oberen Toluol Abbaugene.

3.4.4 *Burkholderia* sp. PS12Δ + pKT231cbd

Zum schnelleren Test auf Funktionalität wurde in den Stamm *Burkholderia* sp. PS12Δ ebenfalls das Plasmid mit den Genen für die 2-Chlorbenzoat Dioxygenase pKT231cbd konjugiert.

Die Klone wurden mit 2-Chlorbenzoat als Substrat selektioniert und ein ausgewählter Klon als *Burkholderia* sp. PS12Δ+pKT231cbd bezeichnet. Im Gegensatz zum Derivat *Burkholderia* sp. PS12*+pKT231cbd enthält dieses Konstrukt keine zusätzliche Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase als Selektionsmarker.

Auch dieses Derivat zeigte nicht das zu erwartende Wachstum mit 2-Chlortoluol bzw. 3-Chlortoluol. Alle notwendigen Bausteine zum Abbau dieser Substrate sind in dem Konstrukt vorhanden, die Tetrachlorbenzol Dioxygenase, welche die initiale Monooxygenierung an der Methylgruppe katalysiert, Enzyme des oberen Toluol Abbauweges zur Dehydrogenierung produzierter Chlorbenzylalkohole zu den entsprechenden Chlorbenzoaten, notwendige Benzoat Dioxygenasen und Enzyme zum Abbau chlorierter und unchlorierter Brenzkatechine.

Da kein Wachstum mit diesen Substraten zu beobachten war, sollte das Konstrukt auf den Umsatz von 2- und 3-Chlortoluol in Anwesenheit von Toluol als Induktor der Tetrachlorbenzol Dioxygenase sowie der Xylol Monooxygenase und als Wachstumssubstrat analysiert werden.

Tabelle 39: Wiederfindungsraten nach Wachstum von *Burkholderia* sp. PS12Δ + pKT231cbd

Substratzugabe	Substrat- konzentration nach Wachstum (2d) [μM]	Substratwieder- findungsrate [%]		Produkt- konzentration nach Wachstum (2d) [μM]		Produkt- findungsrate [%]
2,5mM Toluol + 2,5mM 2-Chlortoluol	<1 534	Toluol	<1	2CBOH	338	14
		2CT	21	2CBzt	55	2
2,5mM Toluol + 2,5mM 3-Chlortoluol	<1 57	Toluol	<1	3CBOH	39	2
		3CT	2	3CBzt	184	7

Nach zwei Tagen Inkubation des Stammes *Burkholderia* sp. PS12Δ + pKT231cbd mit Toluol und einem der beiden Chlortoluole konnte im Überstand kein Toluol oder dessen Abbauprodukte wiedergefunden werden, es wurde vollständig mineralisiert.

Von den eingesetzten Mengen an Chlortoluolen waren im Überstand noch 21% bzw. 2%, als Abbauprodukte 16% bzw. 9% der eingesetzten Mengen an 2-Chlortoluol bzw. 3-Chlortoluol wiederzufinden. Da somit insgesamt nur 37% bzw. 11% der eingesetzten Mengen an 2- bzw. 3-Chlortoluol wiedergefunden werden konnten, liegt die Vermutung nahe, daß die restlichen 63% bzw. 89% metabolisiert worden sind. Dies deutet darauf hin, daß beide Substrate durch diesen Stamm abbaubar ist. Eine Evaporation ist hierbei wiederum nicht endgültig auszuschließen.

3.4.5 *Burkholderia* sp. PS12AL

Die Integration der 2-Chlorbenzoat Dioxygenase Kasette des Minitransposonplasmides pAL1 in den Stamm *Burkholderia* sp. PS12 Δ mittels Konjugation führte zu Klonen, welche mit 2-Chlorbenzoat als Wachstumssubstrat selektioniert wurden. Ein ausgewählter Klon wurde als *Burkholderia* sp. PS12AL bezeichnet und kann als finales Konstrukt des Stammes *Burkholderia* sp. PS12 angesehen werden. Zusätzlich zum Ausgangsstamm *Burkholderia* sp. PS12 sind in diesem Derivat die Gene des oberen Toluol Abbauges sowie die 2-Chlorbenzoat Dioxygenase und eine damit eingeführte Kanamycin Resistenz vorhanden.

Tabelle 40: Wachstum des Stammes *Burkholderia* sp. PS12AL mit unterschiedlichen Substraten in festen (2mM) und flüssigen Medien (5mM)

Substrat	Agar	Flüssigkultur
Toluol	+	+
Benzylalkohol	+	+
Benzoat	+	+
2-Chlorbenzoat	+	+
3-Chlorbenzoat	+	+
4-Chlorbenzoat	-	-
2-Chlorbenzylalkohol	+	+
3-Chlorbenzylalkohol	+	+
2-Chlortoluol	-	-
3-Chlortoluol	-	-
<i>o</i> -Xylol	-	-
<i>m</i> -Xylol	-	-
<i>p</i> -Xylol	-	-
Benzol	+	+
Chlorbenzol	+	+
1,2,4-Trichlorbenzol	+	+
1,2,4,5-Tetrachlorbenzol	+	+

+ Wachstum
- kein Wachstum

Wachstum mit 2-Chlorbenzylalkohol bestätigt die Funktion der integrierten Minitransposonkassetten (obere Toluol Abbaugene und 2-Chlorbenzoat Dioxygenase).

Wachstum mit 2-Chlortoluol und 3-Chlortoluol, zu welchem dieser Stamm theoretisch fähig sein sollte, konnte nicht beobachtet werden.

Auch im Endkonstrukt *Burkholderia* sp. PS12AL sollte untersucht werden, durch welche Wachstumssubstrate die verschiedenen Abbauewege induziert werden.

Tabelle 41: Spezifische Aktivitäten verschiedener Enzyme des Stammes *Burkholderia* sp. PS12AL

	Anzuchtssubstrat	Benzyl- alkohol	3-Chlor- benzoat
Enzym	Substrat in Meßzelle	Aktivität [U/g]	Aktivität [U/g]
Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase	Brenzkatechin	30	<1
Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase	Brenzkatechin	820	840
	3-Methylbrenzkatechin	60	1450
	3-Chlorbrenzkatechin	3	700
<i>cis</i> -3,5-Cyclohexadien-1,2-diol Dehydrogenase	<i>cis</i> -3,5-Cyclohexadien-1,2-diol	10	3
Dienlacton Hydrolase	<i>cis</i> -Dienlacton	30	190
Benzaldehyd Dehydrogenase	Benzaldehyd	130	<1
	2-Chlorbenzaldehyd	30	1
	3-Chlorbenzaldehyd	150	10

Wachstum dieses Konstruktes mit 3-Chlorbenzoat induziert die Enzyme des *ortho*-Abbaueweges. Alle weiteren Enzyme werden, wie zu erwarten, von diesem Substrat nicht induziert, was heißt: Enzyme des *meta*-Weges, der obere Toluol Abbaueweg und auch nicht das Folgeenzym der initialen Tetrachlorbenzol Dioxygenase, die *cis*-3,5-Cyclohexadien-1,2-diol Dehydrogenase. Benzylalkohol verwertende Zellen zeigen neben Induktion der Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase ebenfalls Induktion der Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase, sowie signifikante Aktivitäten der Enzyme des oberen Toluol Abbaueweges.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß ein Wachstum des Stammes *Burkholderia* sp. PS12AL mit 3-Chlortoluol als Substrat prinzipiell möglich sein sollte. Die dazu nötigen Enzyme des oberen Toluol Abbaueweges, ebenso wie die Enzyme des Chlorbrenzkatechin Abbaueweges, zeigen ausreichende Aktivitäten.

3.4.6 Chloridfreisetzung

Der Stamm *Burkholderia* sp. PS12AL wurde in einen Wachstumskolben (OD_{546nm} 0,018) geimpft und 2mM 2-Chlortoluol über die Gasphase gefüttert. Wachstum konnte bezogen auf ein Ansteigen der optischen Dichte nicht beobachtet werden.

Die Messung der Chloridionen im Überstand nach Inkubation des Stammes für 48h ergab einen Wert von 1mM. Dies läßt eine Mineralisierung des 2-Chlortoluols vermuten.

Entsprechend dazu wurde der wässrige Überstand, sowie die Chloroformphase nach Extraktion mit Chloroform, mittels HPLC analysiert. Das Substrat 2-Chlortoluol wurde in einer Konzentration von 0,6mM gefunden. Produkte wie 2-Chlorbenzylalkohol oder 2-Chlorbenzoat konnten nicht nachgewiesen werden.

Die fehlenden 0,4mM des Ausgangssubstrates wurden entweder nicht ausreichend extrahiert oder evaporierten während des Experimentes, was die wahrscheinlichere Lösung darstellt.

Aus diesem Kolben wurden vor diesen Messungen Agarplatten mit Mineralsalzmedium einschließlich 20µl 2-Chlortoluol in der Gasphase beimpft.

Es konnte kein Wachstum des Stammes auf Agarplatte mit 2-Chlortoluol beobachtet werden.

4 Diskussion

Die Konstruktion von Organismen, welche zum Abbau chlorierter Toluole befähigt sein sollen, stand im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Der Abbau von monochlorierten Toluolen ist in sofern interessant, als bis heute nur wenige Organismen beschrieben sind, die 4-Chlortoluol und 3-Chlortoluol mineralisieren können, und für 2-Chlortoluol konnte bisher noch kein Abbauer gefunden werden.

4.1 Ausgangsstamm *Pseudomonas putida* F1

Pseudomonas putida F1 als Ausgangsstamm für die Konstruktion eines Chlortoluol verwertenden Mikroorganismus wurde in Bezug auf die Verwendung von Wachstumssubstraten als auch auf biochemische Eigenschaften hin untersucht. Toluol, Benzol und Benzoat dienen *Pseudomonas putida* F1 als Wachstumssubstrate. Schwaches Wachstum war mit Benzylalkohol zu verzeichnen. Der Stamm stellt einen Dioxygenase-Weg, eine Benzoat Dioxygenase sowie Brenzkatechin abbauende Enzyme bereit.

In diesem Stamm sollten vollständige Abbauwege für monochlorierte Toluole zusammengestellt werden. Da dieses die Etablierung, neben der vorhandenen Toluol 2,3-Dioxygenase, einer Toluol Monooxygenase beinhaltet, war es notwendig, einen einfachen Test zu finden, mit dem zwischen der Induktion der Dioxygenase und der Monooxygenase unterschieden werden konnte. Hierzu bot sich die Analyse der Sauerstoffaufnahme mit Benzol an, da dieses nur durch die Toluol 2,3-Dioxygenase umsetzbar ist, und in der Literatur hohe Aktivitäten der Toluol 2,3-Dioxygenase mit Benzol als Substrat beschrieben wurden (Gibson et al., 1968). Zudem wurde von Beil (persönliche Mitteilung) nachgewiesen, daß Benzol ein gutes Substrat für die Toluol 2,3-Dioxygenase darstellt, und die klonierte Toluol 2,3-Dioxygenase Benzol und Toluol mit ähnlichen Raten umsetzt.

Überraschenderweise zeigten Toluol verwertende Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1 nur eine relativ geringe Sauerstoffaufnahme in Anwesenheit von Benzol, im Gegensatz zu Benzol verwertenden Zellen. Dieses könnte darauf hindeuten, daß der Toluol-Umsatz in Toluol verwertenden Zellen nicht allein durch die Toluol 2,3-Dioxygenase katalysiert wird.

Eaton et al. beschrieben einen *p*-Cymol (*para*-Isopropyltoluol) Abbauweg in *Pseudomonas putida* F1 (Eaton, 1997), in welchem eine Monooxygenierung der Methylgruppe dieses Substrates mit zwei anschließenden sukzessiven Dehydrogenierungen zur Bildung von *p*-Cymat (*para*-Isopropylbenzoat) führt. Zwar analysierten die Autoren keine Substratspezifitäten, es ist jedoch nicht auszuschließen, daß Toluol durch diese Enzyme an der Methylgruppe monooxygeniert und der gebildete Benzylalkohol durch die Dehydrogenasen dieses Abbauweges zu Benzoat transformiert wird, welches durch diesen Stamm verwertet wird. Toluol stellt aber für *Pseudomonas putida* F1 im Gegensatz zu Benzylalkohol ein weitaus besseres Substrat dar. Die relativ schwache Verwertung von Benzylalkohol

und die minimale Aktivität an Benzaldehyd Dehydrogenase in Toluol verwertenden Zellen sind somit Hinweise darauf, daß der Umsatz von Toluol nicht in erster Linie über den Cymol-Abbaupfad verläuft. Regulatorische Phänomene können ausgeschlossen werden, da *p*-Cymat im Cymol-Abbaupfad als Effektor für das Regulatorprotein CymR fungiert (Eaton, 1997). Geht man davon aus, daß Benzoat in Analogie zum *p*-Cymat ebenfalls eine Aufhebung der Repression bewirkt, sollte bei einem signifikanten Abbau von Toluol durch Enzyme des Cymol-Weges auch eine gute Benzylalkohol-Verwertung nachweisbar sein. Zudem wird 4-Chlortoluol durch Toluol verwertende Zellen von *Pseudomonas putida* F1 nicht zu 4-Chlorbenzoat umgesetzt. Auch dieses deutet darauf hin, daß der Cymol-Abbaupfad keine entscheidende Rolle im Abbau von Toluol spielt. Man könnte spekulieren, daß 4-Chlorbenzoat durch weitere Enzyme des Cymat-Abbaupfades metabolisiert würde, es konnten jedoch keine Abbauprodukte eines solchen Weges nachgewiesen werden. Somit kann der Cymol-Abbaupfad keine ausreichende Erklärung für die hohen Sauerstoffaufnahmeleistungen mit Toluol bieten, und eine signifikante Monooxygenierung während des Toluol Abbaus ausgeschlossen werden. Gibson et al. (Gibson et al., 1970b; Gibson et al., 1970c) beschrieben eine Mutante des Stammes *Pseudomonas putida* F1, *Pseudomonas putida* 39/D, welche aufgrund inaktivierter Toluoldihydrodiol Dehydrogenase nicht in der Lage ist, Toluol zu verwerten. Da eine Doppelmutation sehr unwahrscheinlich ist, ist davon auszugehen, daß Toluol nur über einen Abbaupfad, initiiert durch die Toluol 2,3-Dioxygenase, verstoffwechselt wird.

Die Koexistenz multipler Abbaupfade in einem Organismus ist ein sehr komplexes System. Sie ermöglichen dem Organismus, eine große Anzahl verschiedenartiger Substanzen als Wachstumssubstrate zu nutzen. Sind die einzelnen Enzymsysteme dieser unterschiedlichen Abbaupfade nicht sehr spezifisch, kann es zu Problemen kommen, indem Substrate in andere als für sie produktive Abbaupfade geleitet werden. Dadurch können Reaktionsprodukte entstehen, welche als Endmetabolite akkumulieren, oder sogar als Inhibitoren für einzelne Enzymsysteme wirken.

Die einzelnen metabolischen Wege werden durch unterschiedliche aber häufig auch dieselben Substrate induziert. Somit kann es auch auf diesem Weg zur Anschaltung von Abbaupfaden kommen, welche die Substrate in unproduktive Nebenwege leiten.

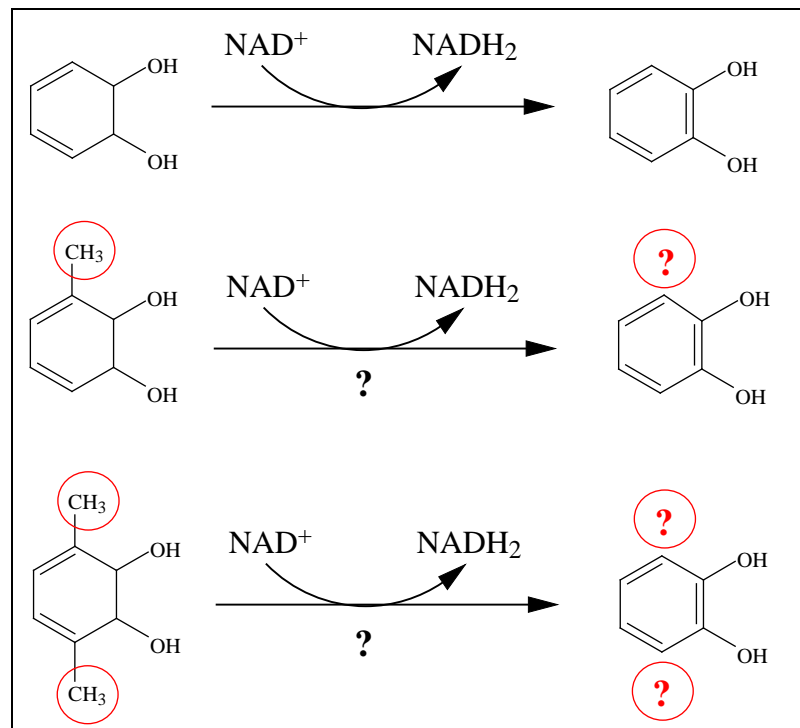
Nimmt man an, daß der Toluol Dioxygenase-Weg der Hauptabbaupfad ist, so stellt sich die Frage, warum Benzol durch Toluol verwertende Zellen schlecht umgesetzt wird. Von Wang et al. (Wang et al., 1995) wurde die DNA vor und hinter den Strukturgenen des Toluol Abbaupfades genauer analysiert. Hinter den Strukturgenen sind die Gene *todS* und *todT* lokalisiert, deren Genprodukte ein Zwei-Komponenten-System der Signalübertragung darstellen. Das *todS*-Genprodukt ist eine sogenannte „Hybrid-Kinase“, die aus sensorischen Histidin-Kinase-Domänen und einer Regulatordomäne besteht. Es wird angenommen, daß TodS in Anwesenheit eines entsprechenden Signals (z. B. Anwesenheit von Toluol) einer Autophosphorylierung unterliegt. Phosphoryliertes TodS phosphoryliert TodT, welches spezifisch an die vor dem *todX*-Gen lokalisierte Promotor Region

bindet und die Expression der Strukturgene aktiviert (Lau et al., 1997). Der vor den Strukturgenen lokalisierte *orf* („open reading frame“) *todX* kodiert für ein Membranprotein, TodX. Inaktivierung von *todX* führte zu einem langsamen Wachstum mit Toluol. Hieraus wurde vermutet, daß eine Funktion von TodX darin besteht, Toluol zu den Abbauenzymen zu transportieren. Dies würde bedeuten, daß der Transport von Toluol geschwindigkeitsbestimmend für den Abbau ist, und könnte darauf hindeuten, daß in Toluol verwertenden Zellen gegenüber Benzol verwertenden Zellen die Benzol-Aufnahme geschwindigkeitsbestimmend ist. Eine weitere wahrscheinlichere Funktion von TodX wurde darin gesehen, daß TodX den Transport von Toluol zum Regulatorprotein TodS erleichtert, und somit eine Funktion in der Regulation des Abbaufweges wahrnimmt. Somit würden jedoch nur die Induktionslevels und nicht die relativen Aktivitäten modulierbar sein.

Nach Lau et al. (Wang et al., 1995; Lau et al., 1997) ist es zudem wahrscheinlich, daß alle *tod* Strukturgene von einem einzigen Promotor aus transkribiert werden, welcher vor *todX* lokalisiert ist. Hinter *todX* und *todF* beschrieben die Autoren jedoch Stellen, die darauf hindeuten, daß die gebildete RNA hier einer Spaltung durch RNase unterliegt. Ob eine entsprechende Modulation der Expression des *tod*-Operons jedoch erfolgt, und ob solche Modulationen letztendlich für unterschiedliche Aktivitäten mit Toluol oder Benzol unter verschiedenen Anzuchtbedingungen verantwortlich sind, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Einen weiteren Hinweis auf Induktion des Dioxygenase Abbaufweges bildet die Analyse der Aktivitäten der *cis*-3,5-Cyclohexadien-1,2-diol Dehydrogenase. Sowohl *cis*-3,5-Cyclohexadien-1,2-diol, welches durch Dioxygenierung des Benzols, als auch 3-Methyl-3,5-cyclohexadien-1,2-diol, welches durch Toluol Dioxygenierung entsteht, stellen Substrate der *cis*-Toluoldihydrodiol Dehydrogenase (TodD) dar. Allerdings beschrieben Lee et al. (Lee et al., 1995) eine Kreuzreaktivität der *p*-Toluatdihydrodiol Dehydrogenase des TOL Plasmides mit Benzoldihydrodiol, Toluoldihydrodiol und *p*-Xyloldihydrodiol, welche durch Dioxygenierung, katalysiert durch die Toluol 2,3-Dioxygenase, aus Toluol, Benzol bzw. *p*-Xylol entstehen. Eine ähnliche Kreuzreaktivität einer Benzoatdihydrodiol Dehydrogenase des Stammes *Pseudomonas putida* F1 mit diesen Dihydrodiolen wäre somit denkbar. Allerdings beschrieben Lee et al. (Lee et al., 1995) Brenzkatechin als Reaktionsprodukt beim Umsatz aller drei analysierten Substrate (Benzoldihydrodiol, Toluoldihydrodiol und *p*-Xyloldihydrodiol) durch die *p*-Toluatdihydrodiol Dehydrogenase (siehe Abbildung 17). Die Produktion von ein und dem selben Produkt aus den drei verschiedenen Substraten ist biochemisch nicht erklärbar und die enzymatischen Untersuchungen sind somit anzuzweifeln.

Abbildung 17: Durch *p*-Toluatdihydrodiol Dehydrogenase katalysierte Reaktionen nach Lee et al. (Lee et al., 1995)



Die in den Abbau von hydrophoben Aromaten wie z. B. Toluol, Benzol oder Chlorbenzol involvierten ring-aktivierenden Dioxygenasen sind in der Regel relativ unspezifisch. So aktiviert z. B. die Toluol Dioxygenase des Stammes *Pseudomonas putida* F1 auch Biphenyl (Furukawa et al., 1993) und verschiedene andere hydrophobe Aromaten. Die Benzoat Dioxygenase aus *Pseudomonas arvilla* C-1 setzt eine Vielzahl substituierter Benzoate wie Amino-, Halogen- und Methyl-derivate um (Yamaguchi und Fujisawa, 1980). Es konnte aber bisher keine Aktivität einer einen hydrophoben Aromaten umsetzenden Toluol Dioxygenase mit einem carboxylierten Substrat oder eine Aktivität einer Benzoat Dioxygenase mit einem nicht carboxylierten Substrat gezeigt werden (Mason und Cammack, 1992). Hinweise auf entsprechende Substratspezifitäten gibt es in der Literatur auch für Dihydrodiol Dehydrogenasen. Reiner (Reiner, 1972) reinigte eine 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure Oxidoreduktase aus *Alcaligenes eutrophus*, welche eine Dehydrogenierung und eine Decarboxylierung der aus Benzoat gebildeten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure katalysiert. Dieses Enzym ist nicht in der Lage, 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol umzusetzen. Fong et al. (Fong et al., 1996) beschrieben die *cis*-Benzoldihydrodiol Dehydrogenase (BedD) des Stammes *Pseudomonas putida* ML2 und konnten keine Aktivität dieses Enzyms mit dem entsprechenden Benzoatdihydrodiol beobachten. Diese *cis*-Benzoldihydrodiol Dehydrogenase (BedD) konnte die Funktion der *cis*-Toluoldihydrodiol Dehydrogenase (TodD), welche in der Mutante *Pseudomonas putida* 39/D defekt ist, übernehmen. Allerdings zeigt dieses Enzym hohe Ähnlichkeit zu Glycerin Dehydrogenasen

(TypIII-Alkohol Dehydrogenasen), während bisher beschriebene Benzoldihydrodiol Dehydrogenasen Ähnlichkeiten mit kurzkettigen Alkohol Dehydrogenasen (TypII) aufweisen, so daß von der Substratspezifität dieses Enzyms nicht auf die Substratspezifität von Enzymen des anderen Typus geschlossen werden kann. Weitere Untersuchungen zur Substratspezifität von Benzoldihydrodiol oder Toluoldihydrodiol Dehydrogenasen beschränkten sich leider auf die Untersuchung des Umsatzes von aus hydrophoben Aromaten gebildeten Dihydrodiolen wie Chlorbenzol-*cis*-dihydrodiol (Spiess und Görisch, 1996), Biphenyldihydrodiol und Naphthalindihydrodiol (Patel und Gibson, 1976; Rogers und Gibson, 1977), die Substrate für diese Enzyme darstellen. Auch Reineke und Knackmuss beschrieben eine breite Substratspezifität von Benzoatdihydrodiol Dehydrogenase bezüglich des Umsatzes verschieden substituierter Benzoatdihydrodirole, analysierten jedoch nicht den Umsatz von Benzol- oder Toluoldihydrodiol (Reineke und Knackmuss, 1978). 3-Chlorbenzoat verwertende Zellen von z. B. *Pseudomonas putida* F1ΔCC zeigen keine Aktivität mit Benzoldihydrodiol (siehe Ergebnisteil Tab. 21), so daß davon auszugehen ist, daß die Aktivität mit Benzoldihydrodiol in *Pseudomonas putida* F1 allein auf eine Aktivität der Toluoldihydrodiol Dehydrogenase des TOD-Abbauweges beruht.

Sauerstoffaufnahmeaktivitäten Toluol verwertender Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1 waren ebenfalls mit Chlorbenzol, mit chlorierten Toluolen als auch mit Xylole zu verzeichnen. Die Akkumulation von 3-Chlorbrenzkatechin beziehungsweise 3-Chlor-6-methylbrenzkatechin in Umsatzexperimenten bestätigt, daß Chlorbenzol bzw. 4-Chlortoluol einer initialen Dioxygenierung unterliegen. Monooxygenierung der Methylgruppe des 4-Chlortoluols, welche bei hoher Aktivität des Cymol Abbauweges auftreten sollte, konnte nicht nachgewiesen werden.

Umsatz von 2- und 3-Chlortoluol hingegen führte durch Monooxygenierung der Methylseitengruppe zur Bildung von 2- bzw. 3-Chlorbenzylalkohol, welche jeweils einer langsamen weiteren Oxidation zum entsprechenden Chlorbenzoat unterlagen. Die nahezu quantitative Akkumulation der Chlorbenzoate zeigt, daß eine Dioxygenierung des aromatischen Ringes nur in geringem Maß stattfindet. Mittels klonierter Toluol 2,3-Dioxygenase konnte nachgewiesen werden, daß in der Tat dieses Enzym die Monooxygenierung von 2- und 3-Chlortoluol zu den entsprechenden Alkoholen katalysiert (Lehning et al., 1997). Mittels GC/MS-Analyse konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, daß auch Dioxygenierungen, jedoch nur in geringem Ausmaß stattfinden (Lehning et al., 1997). Entsprechende Monooxygenierungen wurden von Robertson et al. (Robertson et al., 1992) für 2- und 3-Nitrotoluol durch die Toluol 2,3-Dioxygenase beobachtet, während 4-Nitrotoluol einer Dioxygenierung unterlag.

Auch bei *ortho*- und *meta*-Xylol als Substraten konnte man eine Monooxygenierung einer der Methylseitenketten beobachten, welche zur Bildung von intermediären Methylbenzylalkoholen führte. Diese Intermediate wurden langsam zu den entsprechenden Methylbenzoaten oxidiert, von denen 2-Methylbenzoat akkumulierte und 3-Methylbenzoat scheinbar einem weiteren Metabolismus unterlag. Aufgrund der Analogie dieser beiden Xylole zu 2- bzw. 3-Chlortoluol ist anzunehmen, daß die Monooxygenierung ebenfalls durch die Toluol 2,3-Dioxygenase katalysiert wird. Für *para*-Xylol kann

somit eine Dioxygenierung in Analogie zu 4-Chlortoluol und 4-Nitrotoluol angenommen werden. Ein entsprechender Metabolismus wurde schon von Gibson et al. (Gibson et al., 1974) beschrieben und 3,6-Dimethylbrenzkatechin als Metabolit nachgewiesen. Auch für *meta*-Xylol wurde von Gibson et al. (Gibson et al., 1974) eine Dioxygenierung am aromatischen Ring durch *Pseudomonas putida* 39/D, eine Spontanmutante des Stammes *Pseudomonas putida* F1 (Gibson et al., 1970), angenommen. Es ist jedoch davon auszugehen, daß es sich bei dem von den Autoren beobachteten instabilen Dioxygenierungsprodukt, welches nicht isoliert werden konnte, höchstwahrscheinlich nur um ein Nebenprodukt handelt. Im Falle des Umsatzes von *meta*-Xylol durch *Burkholderia* sp. PS12 (siehe 4.2) konnte diese Nebenreaktion quantifiziert und als von nur untergeordneter Wichtigkeit charakterisiert werden.

4.2 Ausgangsstamm *Burkholderia* sp. PS12

Auch dieser Stamm wurde auf Substratverwertung und biochemische Eigenschaften untersucht. Von den getesteten Substraten erwiesen sich 1,2,4,5-Tetrachlor-, 1,2,4-Trichlor-, 1,4-Dichlor- und Chlorbenzol, sowie Toluol, Benzol, 4-Chlortoluol und 3-Chlorbenzoat als Wachstumssubstrate. Eine Verwertung von Benzol wurde bisher nicht beobachtet (Sander et al., 1991; Beil et al., 1997). Von Tan et al. wurde jedoch die Bildung von Benzoldihydrodiol aus Benzol durch *Burkholderia* sp. PS12 aufgezeigt (Tan et al., 1997), obwohl die Tetrachlorbenzol Dioxygenase dieses Stammes keine Aktivität mit Benzol zeigte (Beil et al., 1997). 3-Chlorbenzoat verwertende Zellen, in denen die Tetrachlorbenzol Dioxygenase induziert ist, zeigten, wie in der Literatur beschrieben, keine Sauerstoffaufnahme mit Benzol als Substrat, wohingegen mit Toluol eine Sauerstoffaufnahme beobachtet werden konnte. Hybridisierungsversuche mit *todC1* (α -Untereinheit der Toluol Dioxygenase von *Pseudomonas putida* F1) als Sonde wiesen darauf hin, daß *Burkholderia* sp. PS12 neben den für die Tetrachlorbenzol Dioxygenase kodierenden Genen keine zur α -Untereinheit der Toluol Dioxygenase homologen Gene, und damit keine zu Benzol Dioxygenasen homologen Gene, enthält (Beil, persönliche Mitteilung). Welche Enzymaktivität für den Benzol Abbau verantwortlich ist, bleibt somit zu klären.

Zusätzlich zu den genannten Wachstumssubstraten konnten Sauerstoffaufnahme mit 2- und 3-Chlortoluol sowie mit *meta*- und *para*-Xylol beobachtet werden. Als initiales Enzym, welches die Dioxygenierung der chlorierten Benzole katalysiert, wurde die Tetrachlorbenzol Dioxygenase beschrieben (Beil et al., 1997). Auch 4-Chlortoluol wird durch dieses Enzym dioxygeniert und das intermediäre Dihydrodiol zu 3-Chlor-6-methylbrenzkatechin umgesetzt, welches durch diesen Stamm verwertet werden kann. Wie für die Toluol 2,3-Dioxygenase des Stammes *Pseudomonas putida* F1 aufgezeigt, stellte sich auch die Tetrachlorbenzol Dioxygenase des Stammes *Burkholderia* sp. PS12 als das Enzym heraus, welches eine Monooxygenierungsreaktion an der Methylgruppe von 2- bzw. 3-Chlortoluol vollzieht. Der gebildete Chlorbenzylalkohol unterliegt in dem Stamm *Burkholderia* sp.

PS12 einer sehr langsamen weiteren Reaktion zum entsprechenden Chlorbenzoat, von denen 2-Chlorbenzoat akkumuliert, während 3-Chlorbenzoat durch den Stamm weiter verwertet wird. Mit den Substraten *ortho*- und *meta*-Xylol wurden analoge monooxygenolytische Reaktionsmechanismen aufgezeigt. Gebildeter 2- bzw. 3-Methylbenzylalkohol wurde nur langsam bis gar nicht umgesetzt. Im Fall von *meta*-Xylol konnte zusätzlich gezeigt werden, daß eine Dioxygenierung des Substrates zwar erfolgt, diese jedoch nur von untergeordneter Wichtigkeit ist, da nur geringe Mengen an 2,4-Dimethylacton als Endprodukt dieser metabolischen Sequenz akkumulierten.

Burkholderia sp. PS12 weist somit eine Tetrachlorbenzol Dioxygenase auf, welche die Methylgruppe von 2- und 3-Chlortoluol monooxygenieren kann, eine Benzoat Dioxygenase und im unteren Abbauweg eine Chlorbrenzkatechin 1,2-Dioxygenase (*ortho*-spaltendes Enzym).

Da das für die Tetrachlorbenzol Dioxygenase kodierende Operon im Gegensatz zum entsprechenden Operon aus *Pseudomonas putida* F1 nicht für eine funktionsfähige Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase kodiert, wurde vermutet, daß intermediäres 3-Methylbrenzkatechin einer *ortho*-Spaltung unterliegt und über 2-Methylacton, welches ein Wachstumssubstrat für *Burkholderia* sp. PS12 darstellt, verstoffwechselt wird. Ein entsprechender Abbau von Toluol über 2-Methylacton als Intermediat wurde von Pettigrew et al. (Pettigrew et al., 1991) für den Stamm *Pseudomonas* sp. JS62, welcher keine Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase enthält, nachgewiesen. Im Gegensatz dazu induzierten Toluol verwertende Zellen von *Burkholderia* sp. PS12 jedoch eine Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase und keine Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase. Die für die Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase kodierenden Gene wurden zumeist in komplexen Operons lokalisiert (van der Meer et al., 1992) und als Induktoren Vorstufen des Metabolismus, wie Methylbenzoate, Methylphenole, Toluol oder bitykliche Aromaten nachgewiesen (Murray et al., 1972; Assinder und Williams, 1990; Kukor und Olsen, 1991), im Gegensatz zu Operons, welche für Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase kodierende Gene enthalten, in denen ein Abbauprodukt, Muconsäure oder substituierte Muconsäure als Induktor wirkt (Assinder und Williams, 1990; Parsek et al., 1992; McFall et al., 1997). Dies stellt die Frage, von woher die Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase-Aktivität für den Toluol Abbau rekrutiert wurde, und ob, wie angenommen, die geringe Aktivität der Tetrachlorbenzol Dioxygenase für den Abbau von Toluol verantwortlich ist. Interessanterweise wurden in den letzten Jahren in einer Reihe von Mikroorganismen multiple Brenzkatechin 2,3-Dioxygenasen nachgewiesen. So klonierten Kitayama et al. (Kitayama et al., 1996) die Gene für drei Brenzkatechin 2,3-Dioxygenasen, welche hohe Sequenzhomologien zu *xylE* des TOL Plasmides aufweisen, und eine Exradiol Dioxygenase, welche Homologie zu einer 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase zeigt, aus dem Benzol Abbauer *Pseudomonas aeruginosa* J1104. Für die den Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase verwandten 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenasen, welche in der Regel Kreuzaktivität mit Brenzkatechin aufweisen, wurden ebenso multiple Gene in PCB-Abbauern gefunden. Asturias und Timmis (Asturias und Timmis, 1993) beschrieben drei verschiedene für 2,3-Dihydroxybiphenyl 1,2-Dioxygenasen kodierende Gene in *Rhodococcus globululus* P6, von denen nur ein Gen im Biphenyl-Operon lokalisiert ist. Kosono et al. (Kosono et al., 1997) konnten zeigen, daß drei der sieben in *Rhodococcus erythropolis*

TA421 vorhandenen *bphC* Gene in einem Biphenyl-Abbau Plasmid lokalisiert sind. Hauschild et al. (Hauschild et al., 1996) konnten in dem PCB-Abbauer *Rhodococcus* sp. RHA1 zwei verschiedene *meta*-spaltende Dioxygenasen nachweisen, welche Aktivitäten mit Brenzkatechin zeigen. Im Gegensatz zu anderen Autoren analysierten Masai et al. (Masai et al., 1997) die Umgebung des für die alternative *meta*-spaltende Aktivität kodierenden Gens und zeigten, daß dieses Gen ebenfalls in einem Operon lokalisiert ist und wahrscheinlich in dem Ethylbenzol-Abbau des Stammes involviert ist. Der Dibenzofuran und Dibenzo-*p*-Dioxin Abbauer *Sphingomonas* sp. RW1 weist ebenfalls multiple für Exradiol Dioxygenasen kodierende Gene auf (Happe et al., 1993; Armengaud et al., 1998). Interessanterweise ist hier das für die 2,2',3-Trihydroxybiphenyl Dioxygenase kodierende Gen *dbfB* nicht in einem Cluster mit anderen Genen des Dibenzofuran-Abbaus lokalisiert. Nur die Lokalisierung des für die Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase aus *Burkholderia* sp. PS12 kodierenden Gens und Analyse des genetischen Umfeldes kann letztendlich zu einer Aussage über die Funktion dieses Enzyms in *Burkholderia* sp. PS12 führen.

4.3 Konstrukte *Pseudomonas putida* F1AL und *Burkholderia* sp. PS12AL

Aufgrund der integrierten Gene war bei Derivaten beider Stämme (*Pseudomonas putida* F1AL und *Burkholderia* sp. PS12AL) ein erweitertes Substratspektrum zu erwarten. So konnten die Substrate Benzylalkohol, 2-Chlorbenzylalkohol und 3-Chlorbenzylalkohol verwertet werden, ebenso stellen für das Derivat *Pseudomonas putida* F1AL 3-Chlortoluol, *meta*-Xylol und Chlorbenzol zusätzliche Wachstumssubstrate dar. 2-Chlortoluol kann von beiden Endkonstrukten metabolisiert, aber nicht als Wachstumssubstrat genutzt werden. Analog ist dies für *Burkholderia* sp. PS12AL mit 3-Chlortoluol zu verzeichnen.

Im weiteren soll auf die einzelnen Abbaupotentiale und die Probleme, welche innerhalb der Abbauwege auftreten, eingegangen werden.

4.3.1 (Chlor-)benzylalkohole

Benzylalkohol, 2-Chlorbenzylalkohol und 3-Chlorbenzylalkohol stellen für *Pseudomonas putida* F1AL und *Burkholderia* sp. PS12AL Wachstumssubstrate dar. Sie werden durch beide Konstrukte mineralisiert. Der Abbau erfolgt jeweils durch zwei sukzessive Dehydrogenierungen katalysiert durch die Benzylalkohol Dehydrogenase und Benzaldehyd Dehydrogenase des oberen Toluol Abbauweges des TOL Plasmides und führt zur Bildung von intermediärem Benzoat bzw. Chlorbenzoat. Benzoat

oder 3-Chlorbenzoat werden durch Benzoat Dioxygenasen, welche beide Ausgangsstämme besitzen, dioxygeniert und zu Brenzkatechin bzw. Chlorbrenzkatechin umgesetzt.

2-Chlorbenzoat wird durch die in die Stämme integrierte 2-Chlorbenzoat Dioxygenase dioxygeniert und ebenfalls zu Brenzkatechin umgesetzt. Das intermediäre Brenzkatechin unterliegt größtenteils einer *ortho*-Spaltung durch eine Brenzkatechin 1,2-Dioxygenase und folgender Mineralisierung, 3- und 4-Chlorbrenzkatechin werden durch eine Chlorbrenzkatechin 1,2-Dioxygenase gespalten und durch weitere Enzyme des Chlorbrenzkatechin Abbauweges in den Tricarbonsäure-Zyklus geleitet.

Abbildung 18: Abbau von Benzylalkohol durch *Pseudomonas putida* F1AL

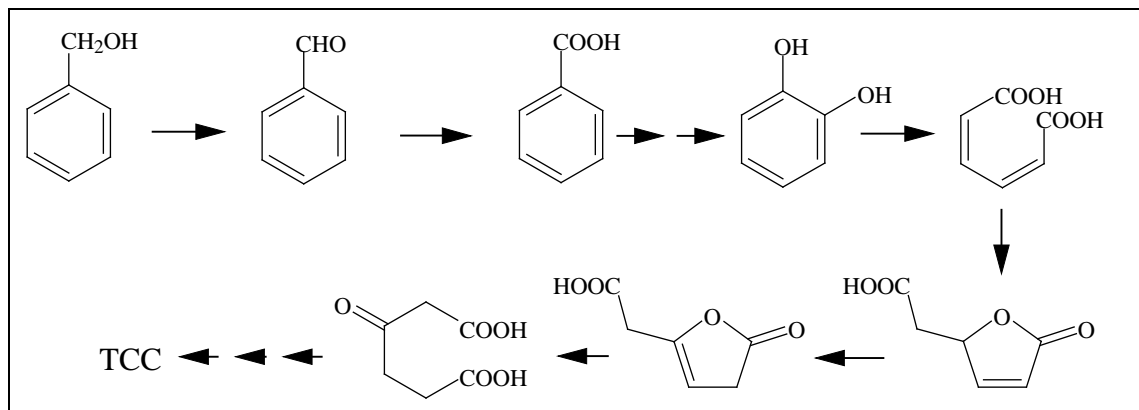


Abbildung 19: Abbau von 2-Chlorbenzylalkohol durch *Pseudomonas putida* F1AL

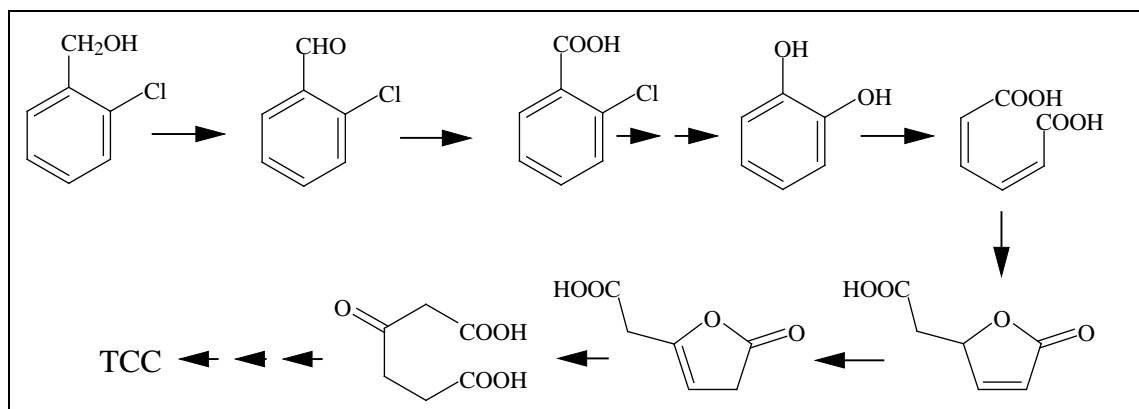
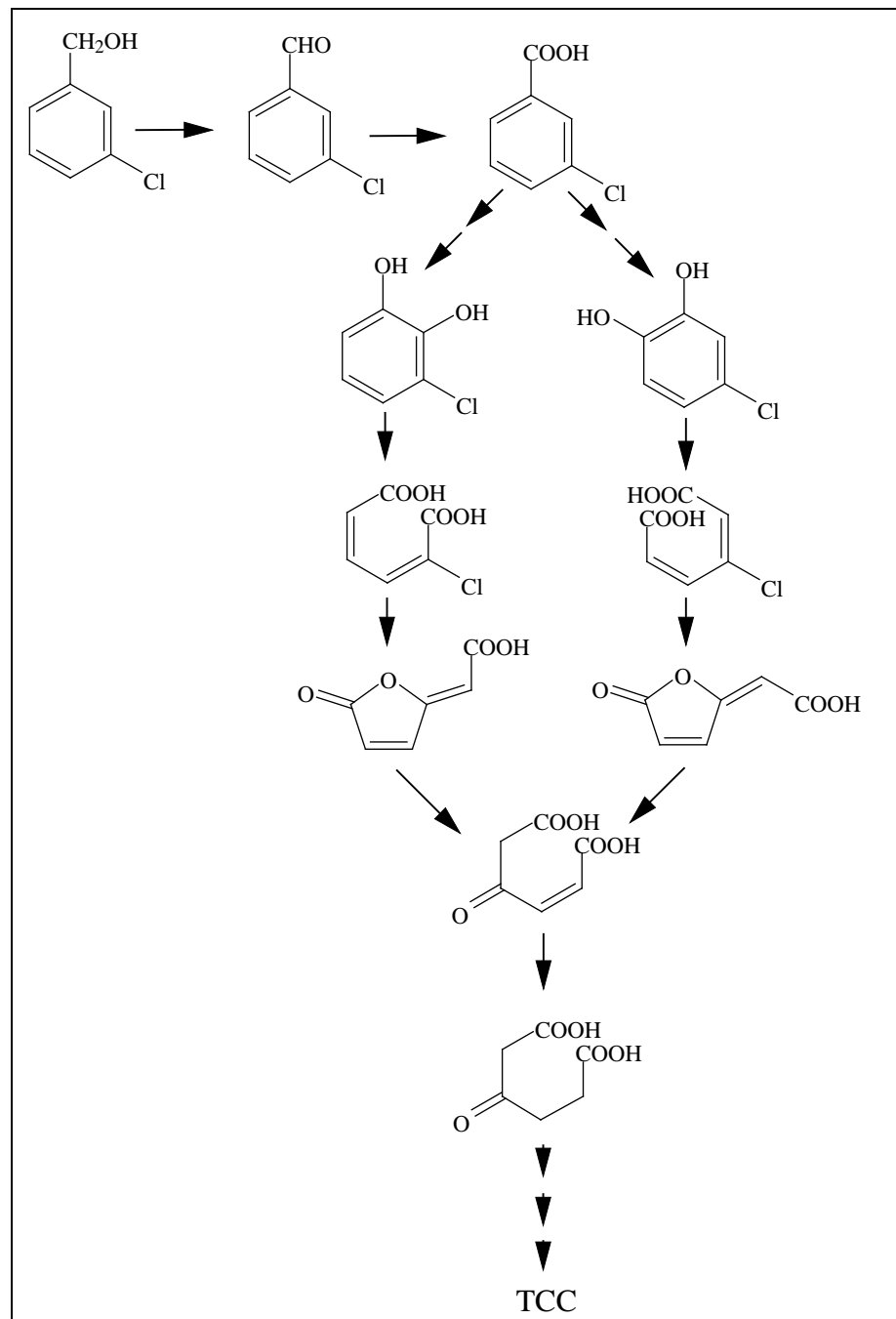
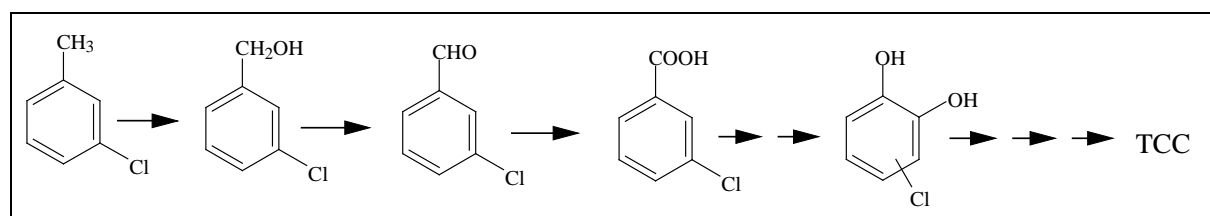


Abbildung 20: Abbau von 3-Chlorbenzylalkohol durch *Pseudomonas putida* F1AL

4.3.2 3-Chlortoluol

Pseudomonas putida F1AL nutzt 3-Chlortoluol als Wachstumssubstrat. Wie im Ergebnisteil unter Tabelle 13 und 26 beschrieben, erfolgt bei Inkubation mit 3-Chlortoluol eine Induktion der Toluol 2,3-Dioxygenase des Ausgangsstammes, die eine Monooxygenierung der Methylgruppe unter Bildung von 3-Chlorbenzylalkohol katalysiert. Wachstum des Stammes ist jedoch nur möglich, wenn zudem der obere Toluol Abbauweg des TOL Plasmides induziert ist. Sowohl das zugeführte Wachstumssubstrat, als auch der durch die Toluol 2,3-Dioxygenase katalysiert gebildete 3-Chlorbenzylalkohol, sind als Induktoren beschrieben.

Abbildung 21: Abbau von 3-Chlortoluol durch *Pseudomonas putida* F1AL



Somit bringt der Umsatz von 3-Chlortoluol wiederum einen Induktor für die oberen Toluol Abbaugene hervor. Die Toluol 2,3-Dioxygenase kann durch 3-Chlortoluol induziert werden, der gebildete 3-Chlorbenzylalkohol stellt aber aller Wahrscheinlichkeit nach keinen Induktor für die Toluol 2,3-Dioxygenase dar. Somit erklärt sich eine verstärkte Induktion der Xylol Monooxygenase im Vergleich zur Toluol 2,3-Dioxygenase in mit 3-Chlortoluol als Kohlenstoffquelle wachsenden Mikroorganismen.

Zumindest in Zellen in der späten exponentiellen Wachstumsphase scheint jedoch der dioxygenolytische Abbauweg, im Gegensatz zu Toluol verwertenden Zellen (siehe Abschnitt 4.3.3), nahezu vollständig abgeschaltet zu sein. Während des Wachstums konkurrieren nicht nur die Toluol 2,3-Dioxygenase und die Xylol Monooxygenase um das Substrat 3-Chlortoluol, sondern auch die Regulationssysteme. Zwar liegen keine entsprechenden Daten für 3-Chlortoluol vor, jedoch zeigten Duetz et al. (Duetz et al., 1994b), daß schon äußerst geringe Konzentrationen an *ortho*-Xylol (3µM) für eine Induktion der Xylol Monooxygenase ausreichen, so daß angenommen werden kann, daß nur geringe Mengen an Induktor zur Induktion des oberen Toluol Abbauweges notwendig sind. Im Gegensatz zur Regulation des oberen Toluol Abbausystems sind Kenntnisse über die Regulation der Toluol 2,3-Dioxygenase sehr beschränkt. Es kann jedoch vermutet werden, daß die mit 3-Chlortoluol hochaktive Xylol Monooxygenase dem als Regulationsmediator angenommenen TodX-Protein das Substrat entzieht (Wang et al., 1995) (siehe auch Abschnitt 4.3.3), so daß die effektive Induktion des TOD-Abbauweges zum Erliegen kommt.

Intermediäres 3-Chlorbenzoat wird durch eine stammeigene Benzoat Dioxygenase und Dihydrodiol Dehydrogenase zu den korrespondierenden Chlorbrenzkatechinen transformiert. Die Induktion der in das Konstrukt integrierten Chlorbrenzkatechin Abbaugene (*tcb*) erfolgt in Analogie zu den Chlorbrenzkatechin Abbaugen des *clc* Operon (McFall et al., 1997) durch Chlormuconsäuren, welche nach *ortho*-Spaltung durch geringe konstitutive Aktivität der Chlorbrenzkatechin 1,2-Dioxygenase gebildet wird.

Burkholderia sp. PS12AL zeigte kein Wachstum mit 3-Chlortoluol, es konnte lediglich ein Umsatz von 3-Chlortoluol durch ruhende Zellen nachgewiesen werden. Hierbei kommt es zu einer Oxidation des 3-Chlortoluols an der Methylgruppe zum 3-Chlorbenzylalkohol mit anschließenden Dehydrogenierungen zum korrespondierendem Benzaldehyd und Benzoat, welches weitermetabolisiert wird. Die initiale Oxidation kann auch in diesem Stamm einerseits auf die Tetrachlorbenzol Dioxygenase sowie auf die Xylol Monooxygenase des TOL Plasmides zurückzuführen sein. Während die Toluol Dioxygenase und der gesamte TOD-Abbauweg in *Pseudomonas putida* F1 einer Regulation unterliegt, wird die Tetrachlorbenzol Dioxygenase in *Burkholderia* sp. PS12 zumindest teilweise konstitutiv exprimiert (Sander et al., 1991). Konstitutive Expression wurde auch für die *tcbAB*-Gene des Stammes *Pseudomonas* sp. P51, die für eine Trichlorbenzol Dioxygenase und Trichlorbenzoldihydrodiol Dehydrogenase kodieren, beschrieben (van der Meer, 1997). 3-Chlortoluol sollte somit durch die Tetrachlorbenzol Dioxygenase des Stammes *Burkholderia* sp. PS12 problemlos zu 3-Chlorbenzylalkohol transformiert werden. Ebenso sollte die Xylol Monooxygenase des oberen Toluol Abbauweges induziert werden und somit diese Reaktion durchführen können. Obwohl *Burkholderia* sp. PS12AL nachweislich 3-Chlorbenzylalkohol verwerten kann, konnte kein Wachstum mit 3-Chlortoluol als alleiniger Kohlenstoffquelle nachgewiesen werden.

Es stellt sich die Frage, warum nicht einmal die Xylol Monooxygenase, welche in *Pseudomonas putida* F1AL die initiale Monooxygenierung katalysiert, diesen Reaktionsschritt in *Burkholderia* sp. PS12AL ausführen kann.

Abbildung 22: Integriertes oberes Toluol Operon des TOL Plasmides

<i>xyl</i> R	<i>Pu</i>	<i>xyl</i> U W C M A B N
--------------	-----------	--------------------------

Gegen ein defektes oberes Toluol Operon spricht die Verwertung von 3-Chlorbenzylalkohol. Für die Verwertung dieses Substrates sind eine funktionsfähige Chlorbenzylalkohol Dehydrogenase und Chlorbenzaldehyd Dehydrogenase notwendig. Shaw und Harayama (Shaw und Harayama, 1990) reinigten eine Benzaldehyd Dehydrogenase aus Benzylalkohol und *meta*-Xylol verwertenden Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* pWW0 auf. Inoue et al. (Inoue et al., 1995) konnten zeigen, daß es sich bei diesem Enzym nicht um die Benzaldehyd Dehydrogenase, sondern um das Produkt von *xylG*

aus dem *meta*-Operon des TOL Plasmides, welches eine 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd Dehydrogenase kodiert, handelt. Zwar wurde dieses Gen *xyIG* nicht in das Konstrukt *Burkholderia* sp. PS12AL integriert, es ist jedoch anzunehmen, daß *Burkholderia* sp. PS12, welcher Toluol über einen Brenzkatechin *meta*-spaltenden Abbauweg mineralisieren kann, ein zu *xyIG* homologes Gen aufweist, so daß letztendlich nicht ausgeschlossen werden kann, daß für den Umsatz von Benzaldehyd diese Aktivität rekrutiert wird. Notwendig ist jedoch die Funktionsfähigkeit einer integrierten Benzylalkohol Dehydrogenase, was darauf hinweist, daß *XylB* exprimiert wird. Zwar zeigten Harayama et al. (Harayama et al., 1986), daß Mutanten, die ein inaktiviertes *xyIB*-Gen aufweisen, noch mit Benzylalkohol wuchsen, aber aufgrund der Beobachtungen von Williams et al. (Williams et al., 1997) ist es unwahrscheinlich, daß *xyIW*, welches große Homologien zu Alkohol Dehydrogenasen aufweist, diese Funktion übernimmt, da die Autoren keine Funktionsfähigkeit eines Genproduktes nachweisen konnten. Welches Enzym somit im Wildstamm die Funktion der Benzylalkohol Dehydrogenase übernehmen kann, ist ungeklärt. Da somit aller Wahrscheinlichkeit nach in *Burkholderia* sp. PS12AL ein funktionsfähiges *xyIB*-Genprodukt gebildet wird, stellt sich die Frage, warum dieses nicht für die Xylol Monooxygenase (*xyIMA*) gilt. Ähnliche Phänomene wurden von McKay et al. (McKay et al., 1997) beim Versuch, das *bph*-Gencluster aus *Rhodococcus globerulus* P6 in *Escherichia coli* zu exprimieren, beobachtet. Während funktionsfähige *bphB*- und *bphC₁*-Genprodukte gebildet wurden, galt dieses nicht für die *bphA*-Genprodukte. Da, wie auch im Falle des oberen Toluol Abbauweges, die Transkription von einem vor dem Gencluster lokalisierten Promotor erfolgt, kann in beiden Fällen die fehlende Aktivität nicht in unzureichender mRNA-Synthese begründet sein. Es ist somit, wie von McKay et al. (McKay et al., 1997) angenommen, zu vermuten, daß die Ursache für die fehlende Xylol Monooxygenase Aktivität in einer ineffizienten Translation, unkorrekter Faltung oder einem schnellen Abbau der Genprodukte zu suchen ist. Die Wichtigkeit des Wirtsstammes für die Bildung aktiver Proteine kann darüber hinaus darin gesehen werden, daß McKay et al. (McKay et al., 1997) zwar eine Aktivität der initialen Dioxygenase in *Pseudomonas putida* nachweisen konnten, jedoch wurde aktives Protein nur bei Wachstum auf festen Medien und nicht in Flüssigkultur nachgewiesen. Daß die Expression der katabolischen Gene des TOL Plasmides ebenfalls abhängig vom Rezipientenstamm ist, konnten auch Ramos-Gonzalez et al. (Ramos-Gonzalez et al., 1991) sowie Benson und Shapiro (Benson und Shapiro, 1978) zeigen. Während *Escherichia coli* EEZ8000 nach Übertragung des TOL Plasmid-Derivates pWW0-EB62 mit Ethylbenzoat wachsen konnte, galt dieses nicht für *Escherichia coli* LE392R und C600R (Ramos-Gonzalez et al., 1991). Entsprechend beobachteten Benson und Shapiro (Benson und Shapiro, 1978) eine Expression der katabolischen Gene des TOL Plasmid-Derivates TOL::Tn401 in *Pseudomonas aeruginosa* PAS102 aber nicht in *Escherichia coli* QSR0.

Interessanterweise konnten auch in eigenen Versuchen zum Transfer des TOL Plasmides in *Burkholderia* sp. PS12 keine 3-Chlortoluol verwertenden Derivate erzeugt werden. Ob die Ursache hier nur in einer mangelhaften Bildung aktiver Proteine oder aber in fehlendem Transfer, wie von

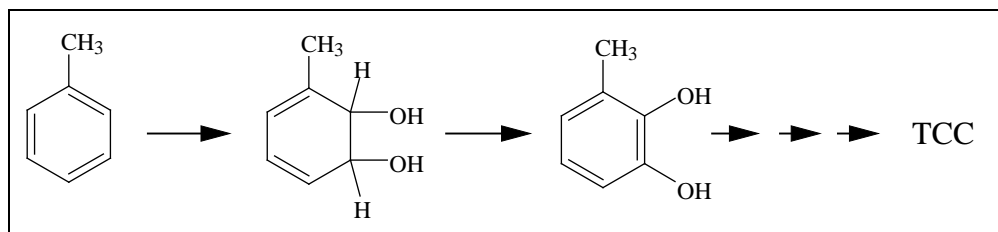
Ramos-Gonzalez et al. (Ramos-Gonzalez et al., 1991) für *Acinetobacter calcoaceticus* und *Alcaligenes* sp. beobachtet, liegt, kann nicht gesagt werden.

4.3.3 Toluol

Beide Endkonstrukte *Pseudomonas putida* F1AL und *Burkholderia* sp. PS12AL sind in der Lage, Toluol als Wachstumssubstrat zu nutzen. Die Toluol 2,3-Dioxygenase des Stammes *Pseudomonas putida* F1AL sowie die integrierte Xylol Monooxygenase sind durch Toluol induzierbar und in der Lage, eine initiale Oxidation am Toluol zu katalysieren. Im Gegensatz zum Umsatz von 3-Chlortoluol jedoch, welches sowohl durch die Toluol Dioxygenase als auch durch die Xylol Monooxygenase zu 3-Chlorbenzylalkohol umgesetzt wird, erfolgt der Umsatz von Toluol durch zwei verschiedene initiale Reaktionsmechanismen. Die Toluol 2,3-Dioxygenase dioxygeniert Toluol am aromatischen Ring unter Bildung eines Dihydrodiols, welches über intermediäres Brenzkatechin mineralisiert wird, während die Xylol Monooxygenase eine Monooxygenierung der Methylgruppe des Toluols unter Produktion von Benzylalkohol katalysiert, welches durch zwei anschließende Dehydrogenierungen zu intermediärem Benzoat umgesetzt und über Brenzkatechin weitermetabolisiert wird.

Enzymtests zeigten eindeutig eine Bevorzugung des dioxygenolytischen Weges in Toluol verwertenden Zellen, was sich an Aktivitäten der 3-Methyl-3,5-Cyclohexadien-1,2-diol Dehydrogenase und an einer Induktion der Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase, welche in einem Operon mit der Toluol 2,3-Dioxygenase organisiert ist, ausmachen läßt.

Abbildung 23: Toluol Abbau durch *Pseudomonas putida* F1AL



Auch das Konstrukt *Burkholderia* sp. PS12AL mineralisiert Toluol über den dioxygenolytischen Abbauweg, hier katalysiert durch die Tetrachlorbenzol Dioxygenase. Die Xylol Monooxygenase scheint, wie unter 4.3.2 beschrieben, nicht funktionsfähig zu sein.

Auch Lee et al. (Lee et al., 1995) konstruierten einen Stamm, welcher beide möglichen Abbauwege in sich vereinte, die Gene des oberen Toluol Abbauweges sowie die Toluol 2,3-Dioxygenase ohne die Toluoldihydrodiol Dehydrogenase (Lee et al., 1995). Die durchgeführten Experimente geben jedoch keinen Aufschluß darüber, wie der Substratfluß über die entsprechenden Abbauwege erfolgt.

Duetz et al. (Duetz et al., 1994b) untersuchten Toluol Abbauer, welche verschiedene Mechanismen des Angriffs am Toluol benutzen, unter anderem *Pseudomonas putida* F1 und *Pseudomonas putida* mt-2 (enthält das TOL Plasmid), auf ihr Durchsetzungsvermögen in einer Mischkultur mit Toluol als alleiniger Kohlenstoffquelle. Die Stämme *Pseudomonas putida* F1 und *Pseudomonas putida* mt-2 unterschieden sich nur unwesentlich in ihrer maximalen Wachstumsrate, *Pseudomonas putida* F1 erreichte jedoch einen höheren Ertrag mit Toluol als Substrat, verglichen mit *Pseudomonas putida* mt-2. In einer kontinuierlichen Kultur unter substratlimitierenden Bedingungen setzte sich *Pseudomonas putida* F1 gegenüber *Pseudomonas putida* mt-2 durch. Dies deutet auf eine höhere Affinität des dioxygenolytischen Abbauweges gegenüber dem monooxygenolytischen Weg des Stammes *Pseudomonas putida* mt-2 für Toluol hin. Dieses Phänomen scheint nicht abhängig vom eingesetzten Stamm, sondern im Abbauweg begründet zu sein, da sich grundsätzlich Stämme, die einen direkten Angriff am aromatischen Ring katalysieren, gegenüber solchen, die die Methylgruppe oxidieren, durchsetzen. Die von Duetz et al. (Duetz et al., 1994b) an Mischkulturen gewonnenen Kenntnisse sind natürlich nicht direkt auf die in vorliegender Arbeit konstruierten Mikroorganismen, die zwei konkurrierende Abbauege beinhalten, zu übertragen. Jedoch konkurrieren auch hier die zwei Abbauege um Substrat und Induktor, und die Annahme einer höheren Affinität von Komponenten des dioxygenolytischen Abbausegmentes gegenüber denjenigen des monooxygenolytischen Abbauweges für Toluol steht in Einklang mit dem anscheinend vorwiegenden Substratfluß in den dioxygenolytischen Abbauweg. (Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß die hohen Induktionslevels an Toluol Dioxygenase gegenüber der Xylol Monooxygenase zwar darauf hinweisen, daß der Substratfluß vor allem in den dioxygenolytischen Abbauweg erfolgt, jedoch ist dieses nur ein qualitativer Hinweis, der keine exakten Aussagen über die Quantität des mittels der jeweiligen Abbauege metabolisierten Substrates gibt.) Diese Argumentation steht nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen bei Wachstum von *Pseudomonas putida* F1AL mit 3-Chlortoluol, da über Affinität gegenüber 3-Chlortoluol zum einen keine Kenntnisse vorliegen, zum anderen der Umsatz von Toluol durch die Toluol 2,3-Dioxygenase einen Induktor entfernt, während bei Umsatz von 3-Chlortoluol wiederum ein Induktor des oberen Toluol Abbauweges gebildet wird.

Bei der Analyse des Substratflusses in verschiedene Abbauege muß zudem das bei der Regulation des TOL Plasmid-stämmigen Abbauweges beobachtete Phänomen der „Katabolitrepression“ in Betracht gezogen werden. Das die Expression des oberen Toluol Abbauweges regulierende Protein XylR wird konstitutiv gebildet und reagiert mit den Substraten und dessen alkoholischen Metaboliten und wirkt als Aktivator des oberen Toluol Abbauweges, indem es die Transkription vom Promotor *Pu* aus auslöst (Abril et al., 1989). Ramos et al. (Ramos et al., 1997) beschrieben, daß der Faktor σ^{54} -abhängige durch XylR regulierte Promotor *Pu* einer Katabolitrepression unterliegt. Z. B. beeinflussen hohe Konzentrationen an Glukose die Verwertung von Benzylalkohol als Substrat (Holtel et al., 1994), ebenso sind Komplexmedien als Repressoren beschrieben. Versuche von Duetz et al. (Duetz et al., 1994a) zeigten, daß in kontinuierlicher Kultur bei Anwesenheit nicht limitierender Mengen an Succinat und in Anwesenheit eines nicht metabolisierbaren Induktors (*ortho*-Xylol) keine

Transkription von *Pu* aus erfolgt. Im Falle einer Succinat-Limitierung erfolgte jedoch Expression. War statt der Kohlenstoffquelle Phosphat oder Sulfat limitierend, so konnte sowohl bei einem Überschuß an Succinat als auch einer metabolisierbaren aromatischen Verbindung wie *meta*-Xylol eine Repression beobachtet werden. Hieraus wurde vermutet, daß entweder ein reprimierender Metabolit akkumulierte oder aber ein hoher Energiestatus zu einer Repression führte (Duetz et al., 1996). Somit unterliegt der obere Toluol Abbauweg in *Pseudomonaden* einem globalen regulatorischen System, welches auf den generellen physiologischen Zustand der Zelle reagiert, wahrscheinlich vermittelt über die Aktivität des σ^{54} -Faktors (Cases et al., 1996). Im Gegensatz zu Zellen, die Toluol nur über den oberen Toluol Abbauweg mineralisieren können, verfügt *Pseudomonas putida* F1AL zusätzlich über den dioxygenolytischen Abbauweg, welcher zudem einen höheren Ertrag liefert. Inwieweit sich dieser zusätzliche Abbauweg auf den „physiologischen Zustand“ der Zellen oder den Energiestatus auswirkt und ob hierdurch in der Tat eine Art „Katabolitrepession“ ausgelöst wird, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

4.3.4 Xylole

meta-Xylol wird durch Konstrukte des Stammes *Pseudomonas putida* F1, welche die oberen Toluol Abbaugene besitzen (*Pseudomonas putida* F1 Δ , *Pseudomonas putida* F1 Δ CC und *Pseudomonas putida* F1AL), als Wachstumssubstrat genutzt. Der Metabolismus des *meta*-Xylols erfolgt durch eine Monooxygenierung einer Methylgruppe dieses Substrates, welche katalysiert sein kann durch die dem Ursprungsstamm eigene Toluol Dioxygenase oder durch die Xylol Monooxygenase des integrierten oberen Toluol Abbauweges. Diese Monooxygenierung führt zur Bildung von 3-Methylbenzylalkohol, welcher anschließend durch zwei Dehydrogenierungen, katalysiert durch die Benzylalkohol und Benzaldehyd Dehydrogenase, zum 3-Methylbenzoat transformiert wird.

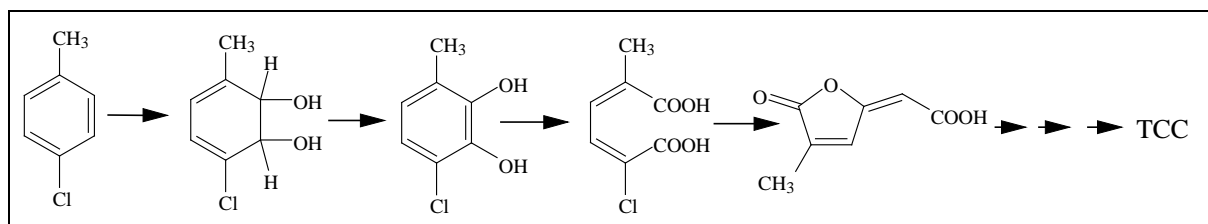
Der Ursprungsstamm *Pseudomonas putida* F1 ist in der Lage, 3-Methylbenzoat als Wachstumssubstrat zu nutzen, so daß eine Mineralisierung von *meta*-Xylol erfolgen kann.

ortho-Xylol konnte dem Konstrukt *Pseudomonas putida* F1AL nicht als Wachstumssubstrat dienen. Zu beobachten war eine Monooxygenierung einer Methylgruppe zu 2-Methylbenzylalkohol mit anschließenden Dehydrogenierungen zu 2-Methylbenzoat, welches akkumulierte. Die initiale Monooxygenierung wurde durch die Toluol Dioxygenase des Ausgangsstammes katalysiert. Die Xylol Monooxygenase des oberen Toluol Abbauweges weist laut Shaw et al. (Shaw und Harayama, 1995) nur eine sehr geringe Aktivität mit *ortho*-Xylol auf. Dahingegen konnten von Brinkmann und Reineke (Brinkmann und Reineke, 1992) gezeigt werden, daß die Benzylalkohol und Benzaldehyd Dehydrogenase des oberen Toluol Abbauweges gute Aktivitäten mit 2-Methylbenzylalkohol und 2-Methylbenzaldehyd aufweisen. Ob 2-Methylbenzoat oder 2-Methylbenzylalkohol durch *Pseudomonas putida* F1AL verwertet wird, wurde nicht getestet. Nach Fetzner et al. (Fetzner et al., 1992) weist die

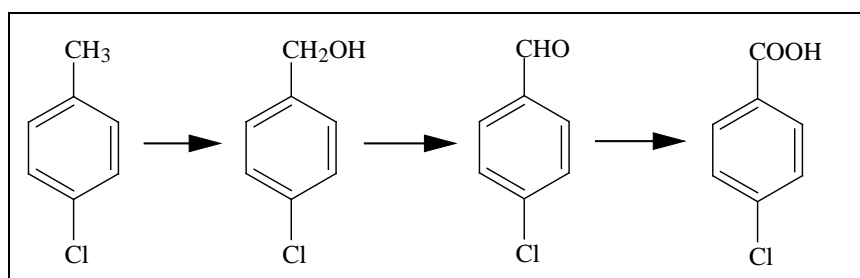
2-Chlorbenzoat Dioxygenase des Stammes *Pseudomonas cepacia* 2CBS im Gegensatz zur z. B. Benzoat Dioxygenase aus *Pseudomonas* sp. B13 und Toluat Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* mt-2 (Reineke und Knackmuss, 1978) eine signifikante Aktivität (40% der mit 2-Chlorbenzoat nachgewiesenen Aktivität) mit 2-Methylbenzoat auf. Als Produkt dieser Umwandlung wurde 2-Methylphenol angenommen. Eine entsprechende Reaktion zu 2-Methylphenol wurde auch beim Umsatz durch den 2-Chlorbenzoat verwertenden Stamm *Pseudomonas putida* CLB 250 (Engesser und Schulte, 1989) beschrieben. Die Autoren beobachteten hierbei die Bildung eines äußerst instabilen Zwischenproduktes, welches zu 2-Methylphenol rearomatisierte und nahmen an, daß es sich bei dem Zwischenprodukt um 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-2-methylcarbonsäure handelt. Dies steht in Einklang mit der Tatsache, daß trotz Induktion einer Dihydroxybenzoat Dehydrogenase keine weitere Umwandlung zu einem Methylbrenzkatechin beobachtet wurde. In Übereinstimmung mit dem postulierten 1,2-Angriff der 2-Chlorbenzoat 1,2-Dioxygenase an 2-Methylbenzoat steht auch die Tatsache, daß *Pseudomonas cepacia* 2CBS trotz Vorhandenseins eines *meta*-spaltenden Abbauweges 2-Methylbenzoat nicht als Wachstumssubstrat nutzen konnte (Fetzner et al., 1989). Zum weiteren Metabolismus von 2-Methylbenzoat fehlt dem Konstrukt *Pseudomonas putida* F1AL somit eine 2-Methylbenzoat 1,6-Dioxygenase. Ein Enzym mit entsprechender Regioselektivität wurde von Engelberts et al. (Engelberts et al., 1989) in dem Stamm *Pseudomonas* sp. WR401 beschrieben. Dieser setzt 2-Methylbenzoat über intermediäres 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-6-methylcarbonsäure zu 3-Methylbrenzkatechin um, welches über einen *meta*-spaltenden Abbauweg weiter verstoffwechselt wird. Weiterhin ist dieser Stamm in der Lage, 2-Chlorbenzoat durch 1,6-Dioxygenierung zu 1,2-Dihydro-1,2-dihydroxy-6-chlorbenzoat und weiter zu 3-Chlorbrenzkatechin umzusetzen. Auch dieses Enzymsystem kann, wie von Hartmann et al. (Hartmann et al., 1989) gezeigt, zur Konstruktion von 2-Chlorbenzoat Abbauern genutzt werden. Im Gegensatz zum in vorliegender Arbeit konstruierten Stamm *Pseudomonas putida* F1AL, in dem 2-Chlorbenzoat durch eine 2-Chlorbenzoat 1,2-Dioxygenase direkt zu Brenzkatechin umgesetzt wird, welches dann weiter über den 3-Oxo adipat-Weg verstoffwechselt wird, erfolgt der Abbau im von Hartmann et al. (Hartmann et al., 1989) konstruierten Stamm JH230 über 1,6-Dioxygenierung mit 3-Chlorbrenzkatechin als Intermediat, welches über Enzyme des Chlorbrenzkatechin Stoffwechsels in den Tricarbonsäure-Zyklus eingeschleust wird.

4.3.5 4-Chlortoluol

Der Ausgangsstamm *Burkholderia* sp. PS12 wächst mit 4-Chlortoluol als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle (siehe Abbildung 24). Die Tetrachlorbenzol Dioxygenase dieses Stammes dioxygeniert 4-Chlortoluol am aromatischen Ring unter Bildung eines Dihydrodiols, welches durch Dehydrogenierung zu 3-Chlor-6-methylbrenzkatechin transformiert wird. Eine folgende *ortho*-Spaltung führt zu Intermediaten, welche in den Tricarbonsäure-Zyklus geschleust werden.

Abbildung 24: 4-Chlortoluol Abbau durch *Burkholderia* sp. PS12

Ein Wachstum des Konstruktes *Pseudomonas putida* F1AL mit 4-Chlortoluol konnte nicht beobachtet werden. 4-Chlortoluol kann einerseits wie für den Stamm *Burkholderia* sp. PS12 beschrieben durch die Toluol 2,3-Dioxygenase (siehe Abbildung 24) zum entsprechenden Dihydrodiol dioxygeniert und zu 3-Chlor-6-methylbrenzkatechin dehydrogeniert werden. Eine folgende *ortho*-Spaltung und weiterer Umsatz durch Enzyme des eingebrachten Chlorbrenzkatechin Abbauweges sollte zur Mineralisierung führen. Andererseits kann 4-Chlortoluol durch die Xylol Monooxygenase des integrierten oberen Toluol Abbauweges monooxygeniert werden (siehe Abbildung 25) und durch die Benzylalkohol Dehydrogenase und Benzaldehyd Dehydrogenase zu 4-Chlorbenzoat umgesetzt werden, für dessen Abbau in diesem Konstrukt kein Enzym, sprich 4-Chlorbenzoat Dioxygenase, vorhanden ist, so daß 4-Chlorbenzoat ein „dead-end“ Produkt darstellt.

Abbildung 25: Fehlleitung des 4-Chlortoluols in einen unproduktiven Seitenweg

Das fehlende Wachstum mit 4-Chlortoluol kann somit auf einer signifikanten Fehlleitung von 4-Chlortoluol zu 4-Chlorbenzoat als „dead-end“ Produkt beruhen. Toluol verwertende Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1AL zeigen hohe Aktivität des Dioxygenase Abbausegmentes, so daß davon auszugehen ist, daß dieses Substrat nur zu untergeordneten Mengen über den Monooxygenase Abbauweg umgesetzt wird, während 3-Chlortoluol verwertende Zellen neben einer hohen Monooxygenase Aktivität nur geringe Mengen an Enzymen des Dioxygenase Weges bilden. Wie 3-Chlortoluol ist auch 4-Chlortoluol ein äußerst potenter Induktor des oberen Toluol Abbauweges und deutlich effektiver als Toluol, ähnlich ist 4-Chlorbenzylalkohol wie 3-Chlorbenzylalkohol ein sehr guter Induktor (Abril et al., 1989). Im Gegensatz zu 3-Chlortoluol ist jedoch zu berücksichtigen, daß

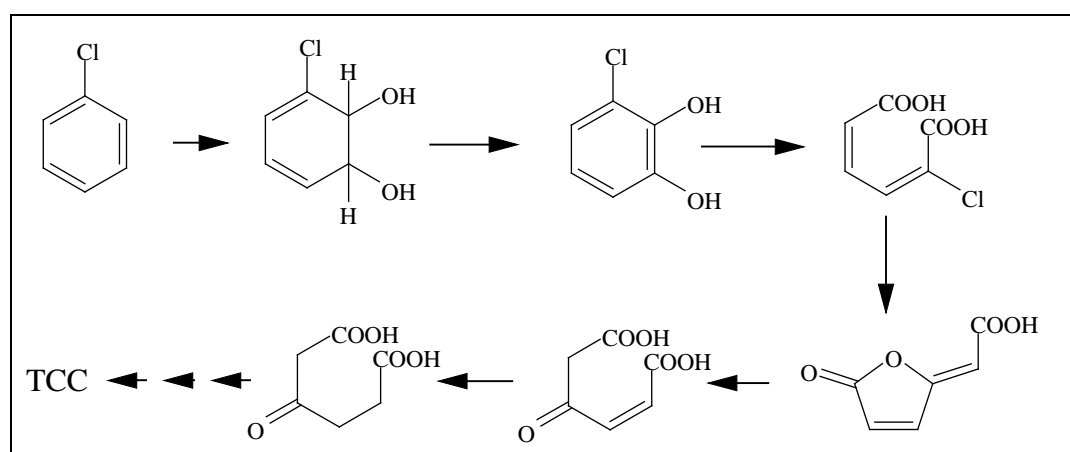
4-Chlortoluol durch die Toluol 2,3-Dioxygenase nicht zu 4-Chlorbenzylalkohol, also einem Induktor des oberen Toluol Abbaufweges umgewandelt wird, sondern zu einem Dihydrodiol.

Es kann somit vermutet werden, daß in Anwesenheit von 4-Chlortoluol durchaus signifikante Mengen an Enzymen des oberen Toluol Abbaufweges induziert werden. Da jedoch die Xylol Monooxygenase des oberen Toluol Abbaufweges eine relativ hohe Kreuzreaktivität mit 4-Chlortoluol aufweist (Brinkmann und Reineke, 1992), während die Toluol 2,3-Dioxygenase 4-Chlortoluol nur mit ca. 5% der mit Toluol als Substrat beobachteten Rate umsetzt, ist anzunehmen, daß schon bei einem relativ geringen Anteil an Xylol Monooxygenase ein signifikanter Anteil an 4-Chlortoluol in das unproduktive Abbausegment geschleust wird.

4.3.6 Chlorbenzol

Chlorbenzol kann von beiden Endkonstrukten als Wachstumssubstrat genutzt werden. Im Fall des Stammes *Burkholderia* sp. PS12AL liegt diese Fähigkeit schon im Ausgangsstamm *Burkholderia* sp. PS12 begründet, welcher Chlorbenzol katalysiert durch die Tetrachlorbenzol Dioxygenase zum Dihydrodiol dioxygeniert und anschließend zu 3-Chlorbrenzkatechin dehydrogeniert, welches über den modifizierten *ortho*-Weg gespalten und zu Intermediaten des Tricarbonsäure-Zyklus umgesetzt wird.

Abbildung 26: Chlorbenzol Abbau durch *Burkholderia* sp. PS12



Pseudomonas putida F1AL wie auch *Pseudomonas putida* F1ΔCC sind ebenfalls in der Lage, Chlorbenzol als Wachstumssubstrat zu nutzen, jedoch erfolgt der Abbau erst nach Spontanmutation. Dieses Substrat wird analog dem Abbau durch *Burkholderia* sp. PS12 (siehe Abbildung 26), mittels einer initialen Dioxygenierung durch die Toluol 2,3-Dioxygenase, Dehydrogenierung des

Dihydrodiols zu 3-Chlorbrenzkatechin und anschließender *ortho*-Spaltung durch die Enzyme des integrierten Chlorbrenzkatechin Abbauweges verstoffwechselt. Eine Erklärung dafür, daß Chlorbenzol erst nach Mutation verwertet wird, könnte in der Regulation des initialen Enzyms, der Toluol 2,3-Dioxygenase zu suchen sein. Eine Mutation im regulatorischen System, wie sie z. B. für die Regulation von *xylR* und *xylS* des TOL-Systems beschrieben sind (Franklin et al., 1983; Delgado et al., 1995), könnte zu einer Verbesserung der Induktionskapazität führen. Bezüglich der Induktion der Toluol 2,3-Dioxygenase durch Chlorbenzol konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Ausgangsstamm *Pseudomonas putida* F1 und dem Endkonstrukt *Pseudomonas putida* F1AL beobachtet werden.

Als weitere Erklärungsmöglichkeit dafür, daß Wachstum mit Chlorbenzol erst nach Mutation möglich war, bietet sich die störende Koinduktion einer *meta*-spaltenden Enzymaktivität mit der für den Abbau von Chlorbenzol notwendigen Dioxygenase in *Pseudomonas putida* F1AL an.

So zeigten Reineke et al. (Reineke et al., 1982) anhand der Konstruktion Chlorbenzoat abbauender Mikroorganismen, daß für den Abbau von 4-Chlorbenzoat die Unterdrückung des *meta*-spaltenden Abbauweges unabdingbar ist, um die Fehlleitung von chlorierten Brenzkatechinen zu vermeiden. In dem 4-Chlorbenzoat verwertenden Stamm WR211, welcher durch Transfer der Chlorbrenzkatechin Abbaugene in einen das TOL Plasmid enthaltenden Stamm gewonnen wurde, konnten sie eine Inaktivierung des *meta*-Weges durch Insertion eines 3,2kb Fragmentes in das *xyIE* Gen feststellen (Jeenes et al., 1982). Im Fall der 3-Chlorbenzoat-Verwertung konnte eine Koexistenz von *meta*- und *ortho*-spaltendem Abbauweg gezeigt werden, wobei jedoch die Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase sehr schnell durch 3-Chlorbrenzkatechin inaktiviert wurde (Reineke et al., 1982). Diese Suizidinaktivierung der Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase durch das aus 3-Chlorbrenzkatechin gebildete Ringspaltungsprodukt ist jedoch ein äußerst Energie konsumierender Mechanismus der Regulation. Kontinuierliches Wachstum mit 3-Chlorbenzoat führte hier ebenfalls zu Derivaten, die eine Inaktivierung im *xyIE* Gen aufwiesen, oder aber das TOL-Plasmid verloren hatten (Reineke et al., 1982). Assinder und Williams (Assinder und Williams, 1990) beschrieben den Verlust eines 39kb Fragmentes des TOL Plasmides, welches sowohl Gene des oberen Abbauweges als auch Gene des *meta*-spaltenden Abbauweges und die regulatorischen Regionen umfaßt, bei unlimitiertem Wachstum mit Benzoat. Brinkmann et al. (Brinkmann et al., 1994) konnten bei unlimitiertem Wachstum mit Toluol des Stammes *Pseudomonas putida* PaW1, welcher das TOL-Plasmid enthält, eine Deletion im *meta*-Operon nachweisen.

Entsprechende Verluste von Teilen des TOL-Plasmides konnten ebenfalls bei der Selektion Chlortoluol verwertender Mikroorganismen beobachtet werden (Brinkmann und Reineke, 1992). Während somit das TOL-Plasmid genetisch relativ flexibel ist, wurden entsprechende Flexibilitäten der *tod*-Gene bisher nicht beschrieben. Zudem zeigten die Arbeiten von Brinkmann und Reineke (Brinkmann und Reineke, 1992), daß eine 3-Chlortoluol Verwertung durchaus in Anwesenheit eines funktionsfähigen *meta*-Weges möglich ist. Auch in dem im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Stamm *Pseudomonas putida* F1AL konnte gezeigt werden, daß Chlorbenzol verwertende Zellen

Aktivität der Brenzkatechin 2,3-Dioxygenase aufweisen, und diese somit nicht irreversibel zerstört ist. Die *meta*-spaltende Aktivität ist somit durchaus kompatibel mit dem Wachstum mit Chlorbenzol, wie auch mit 3-Chlortoluol, und eine Inaktivität dieser ist nicht die Ursache für das beobachtete Wachstum mit Chlorbenzol.

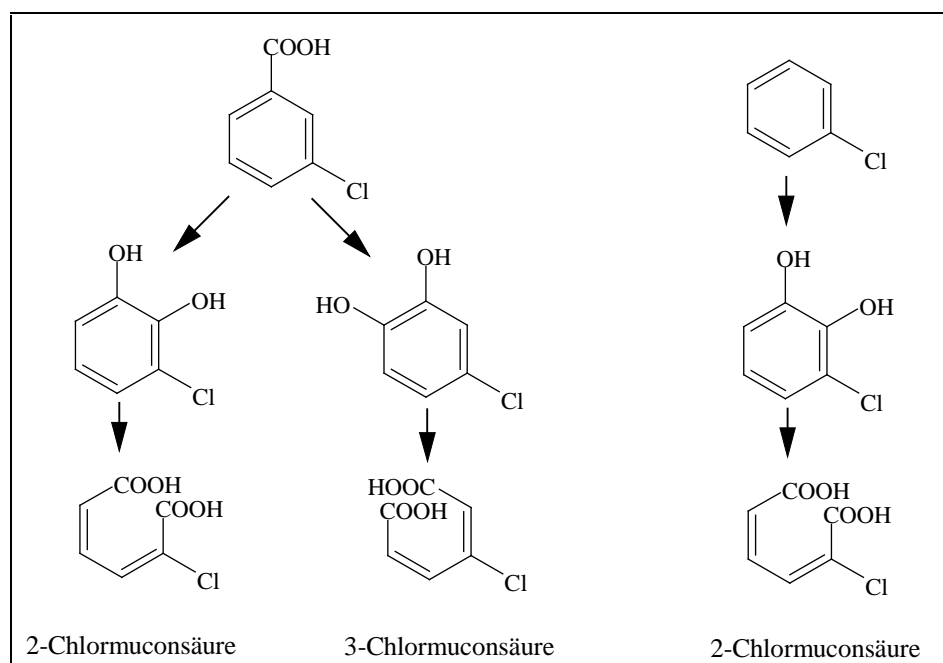
Bei Inkubation des Stammes *Pseudomonas putida* F1AL mit Chlorbenzol konnte eine Schwarzfärbung des Mediums beobachtet werden. Dies deutet auf Probleme bei der Induktion des Chlorbrenzkatechin Abbauweges hin. Gene, die für Enzyme zum Abbau von Chlorbrenzkatechin kodieren, wurden inzwischen aus verschiedenen Mikroorganismen beschrieben und umfassen das *tcb*-Gencluster aus *Pseudomonas* sp. P51, das *clc*-Gencluster aus *Pseudomonas putida* AC27 und das *tfd*-Gencluster aus *Ralstonia eutropha* JMP134 (van der Meer et al., 1992). Die Strukturgene, kodierend für Chlorbrenzkatechin 1,2-Dioxygenase, Chlormuconsäure Cycloisomerase, Dienlacton Hydrolase und Maleylacetat Reduktase liegen geclustert vor (van der Meer et al., 1992). Die Regulation erfolgt durch positive Regulatoren, die zur LysR Familie (Henikoff et al., 1988) gehören. Das Regulatorgen ist vor den Strukturgenen lokalisiert, wird jedoch in gegensätzlicher Richtung abgelesen (Im Falle des *tfd*-Operons ist das Regulatorgen *tfdT* jedoch defekt und es wird angenommen, daß die Produkte der Gene *tfdR* und *tfdS* die Regulationsfunktion übernehmen (van der Meer, 1997)). Die Regulatorproteine weisen Homologien zu CatR auf, welches als Regulator des 3-Oxo adipat-Weges in *Pseudomonas putida* beschrieben wurde (Parsek et al., 1992). Ausführliche Induktionsstudien wurden für CatR und ClcR durchgeführt (Parsek et al., 1992; McFall et al., 1997). Letzteres reguliert die Expression des *clc*-Operons aus *Pseudomonas putida*, d. h. dessen Chlorbrenzkatechin Abbauweg (McFall et al., 1997). Während Muconsäure als Induktor des 3-Oxo adipat-Weges in *Pseudomonas putida* nachgewiesen wurde (Parsek et al., 1992), wurde 2-Chlormuconsäure als Induktor des Chlorbrenzkatechin Abbauweges beschrieben (McFall et al., 1997). In Analogie wurde 2-Chlormuconsäure auch als Induktor des Chlorbrenzkatechin Abbauweges in anderen Mikroorganismen angenommen (McFall et al., 1997). Die in vorliegender Arbeit verwendeten Gene entstammen dem 1,2,4-Trichlorbenzol verwertenden Stamm *Pseudomonas* sp. P51, welcher zusätzlich zu diesem Substrat 1,2- und 1,4-Dichlorbenzol mineralisieren kann (van der Meer et al., 1991a). Ein Wachstum mit Chlorbenzol wurde nicht ausführlich beschrieben, doch scheint dieses Substrat grundsätzlich verwertbar zu sein (van der Meer et al., 1991a).

In vorliegender Arbeit wurden Transkonjuganten, welche die Chlorbrenzkatechin Abbaugene im Chromosom integriert hatten, durch Wachstum auf 3-Chlorbenzoat haltigen Nährböden, welche zusätzlich Kanamycin enthielten, isoliert. Entsprechend konnten durch Direktselektion von Barbara Jakobs eine Vielzahl neuartiger Chloraromaten verwertender Mikroorganismen gewonnen werden (Jakobs, 1997). Wurden jedoch gegenüber Kanamycin resistente Derivate des Stammes *Pseudomonas putida* KT2442, welche eine Integration der Chlorbrenzkatechin Abbaukassette in das Chromosom enthalten sollten, auf ihre Fähigkeit zur Verwertung von 3-Chlorbenzoat getestet, so wurde festgestellt, daß nur ca. 1% der Kanamycin resistenten Klone 3-Chlorbenzoat verwerten konnten.

Dasselbe Phänomen wurde beobachtet, wenn die Chlorbrenzkatechin Abbaugene mit Selektionsmarker integriert in einem „broad-host-range“-Plasmid übertragen wurden. Wurde das aus einem 3-Chlorbenzoat verwertenden Derivat reisolierte Plasmid erneut in *Pseudomonas putida* KT2442 übertragen, so waren mehr als 90% der Kanamycin resistenten Rezipienten auch in der Lage, 3-Chlorbenzoat zu verwerten.

Klemba (persönliche Mitteilung) konnte inzwischen zeigen, daß sich das Chlorbrenzkatechin-Operon des Derivates durch eine spontane Punktmutation im für das Regulatorprotein TcbR kodierenden Gen von dem ursprünglichen Operon unterscheidet. Es ist somit zu vermuten, daß die aus 3-Chlorbenzoat gebildeten Chlormuconsäuren keine Induktoren für das *tcb*-Operon darstellen und diese erst nach Mutation als Induktoren erkannt werden, d. h. daß das originäre *tcb*-Operon augenscheinlich nur durch Dichlormuconsäuren und Trichlormuconsäure als Metabolite des Abbaus von Di- und Trichlorbenzolen induziert wird.

Mutationen in Genen, welche für Proteine der LysR Familie kodieren, lassen sich scheinbar leicht hervorrufen. NahR, der Regulator des Naphthalin Abbaus in *Pseudomonas putida* G7, gehört wie TcbR ebenfalls zu dieser Familie von Regulatoren und reagiert auf die Anwesenheit von Salicylat und Analoga (Barnsley, 1976; Schell, 1985; Yen und Gunsalus, 1985). Cebolla et al. (Cebolla et al., 1997) konnten verschiedene mutierte NahR Proteine produzieren. Der Austausch von einzelnen Aminosäuren führte zu signifikanten Veränderungen des Effektorspezifität, wie dem Erkennen vorher nicht als Effektor dienender Aromaten. Es kann somit vermutet werden, daß der Stamm *Pseudomonas putida* F1AL, welcher mit 3-Chlorbenzoat, 3-Chlortoluol und 3-Chlorbenzylalkohol wachsen kann, ein gegenüber dem Ursprungsoperon verändertes Regulatorprotein aufweist, welches im Gegensatz zu TcbR Chlormuconsäure als Effektor erkennt. Während 3-Chlorbenzoat, 3-Chlortoluol und 3-Chlorbenzylalkohol über 3- und 4-Chlorbrenzkatechin und somit über 2- und 3-Chlormuconsäure verstoffwechselt werden, wurde bei Chlorbenzol verwertenden Zellen nur die Produktion von 3-Chlorbrenzkatechin beobachtet und damit ein Abbau über 2-Chlormuconsäure.

Abbildung 27: Bildung möglicher Induktoren aus 3-Chlorbenzoat und Chlorbenzol

Unter der Annahme, daß ein mutierter Regulator 3-Chlormuconsäure aber noch nicht 2-Chlormuconsäure als Effektor erkennt, ist es erklärbar, daß zwar 3-Chlortoluol und 3-Chlorbenzylalkohol direkt, jedoch Chlorbenzol erst nach Mutation durch *Pseudomonas putida* F1AL verwertet werden. Diese Hypothese kann jedoch nur durch Sequenzierung und genaue Analyse des Regulatorproteins Chlorbenzol verwertender Zellen überprüft werden.

4.3.7 2-Chlortoluol

Beide Endkonstrukte *Pseudomonas putida* F1AL und *Burkholderia* sp. PS12AL waren nicht in der Lage, 2-Chlortoluol als Wachstumssubstrat zu nutzen. Dahingegen konnten beide Konstrukte mit 2-Chlorbenzoat sowie auch mit 2-Chlorbenzylalkohol wachsen, d.h. diese Verbindung als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen.

Somit kann als entscheidender kritischer Schritt im Abbau von 2-Chlortoluol die initiale Oxidation angesehen werden. Diese sollte in beiden Organismen durch die dem Stamm eigene Dioxygenase (Toluol Dioxygenase bzw. Tetrachlorbenzol Dioxygenase) katalysiert werden. Die Monooxygenierung von 2-Chlortoluol zu 2-Chlorbenzylalkohol durch *Pseudomonas putida* F1AL und *Burkholderia* sp. PS12AL kann aber beobachtet werden, wenn die Stämme, nach Wachstum mit die Dioxygenase induzierenden Substraten, mit 2-Chlortoluol inkubiert werden, oder wenn die Stämme mit diesen Substraten und 2-Chlortoluol kokultiviert werden. Daß diese Zellen ein Mineralisierungspotential haben, läßt sich zum einen aus Experimenten ersehen, in denen 2-

Chlortoluol zusätzlich zum Wachstumssubstrat als Kosubstrat zugegeben wurde, und zum anderen an der Chlorideliminierung bei Inkubation von *Burkholderia* sp. PS12AL mit 2-Chlortoluol als einziger Kohlenstoffquelle.

Es stellt sich jedoch die Frage, warum diese Stämme 2-Chlortoluol nicht als Wachstumssubstrat nutzen können. Die Toluol 2,3-Dioxygenase des Stammes *Pseudomonas putida* F1AL ist wie im Ergebnisteil in Tabelle 13 und 26 gezeigt durch 2-Chlortoluol induzierbar. Diese Induktion ist aber im Vergleich zu der mit Toluol oder Chlorbenzol relativ gering. Nimmt man realistischerweise an, daß der Umsatz von 2-Chlortoluol durch mit diesem Substrat induzierte Zellen ca. 5-10% der Umsatzgeschwindigkeit von Toluol durch Toluol verwertende Zellen beträgt, so ist, unter der Voraussetzung der initialen Aktivierung, als geschwindigkeitsbestimmender Schritt eine maximale Wachstumsrate μ von ca. 0,02/h - 0,04/h und somit eine Verdopplungszeit t_d von ca. 20 - 35h zu erwarten. Verdopplungszeiten bei Wachstum mit Fremdstoffen liegen typischerweise im Bereich weniger Stunden, Brinkmann und Reineke (Brinkmann und Reineke, 1992) beschrieben Verdopplungszeiten von 14h bei Wachstum von *Pseudomonas* sp. WR1412 und *Pseudomonas cepacia* WR233 mit 3-Chlortoluol.

Burkholderia sp. PS12AL, welcher eine zumindest partiell konstitutiv exprimierte Dioxygenase besitzt, war weder zu einer Verwertung von 2-Chlortoluol noch von 3-Chlortoluol in der Lage (siehe Abschnitt 4.3.2). Die mit diesen Substraten beobachteten Umsatzraten durch 3-Chlorbenzoat verwertende Zellen des Stammes *Burkholderia* sp. PS12 entsprechen denen Toluol verwertender Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1 (Lehning et al., 1997), so daß bei *Burkholderia* sp. PS12AL Wachstumsraten mit 2-Chlortoluol in der Größenordnung der für *Pseudomonas putida* F1AL geschätzten zu erwarten wären.

Nachdem Wachstumsversuche in „batch“-Kultur erfolglos waren, wurden erste Versuche unternommen, ein Wachstum in kontinuierlicher Kultur zu erreichen. Während Chlorbenzol und 3-Chlortoluol unter diesen Bedingungen mineralisiert wurden, gilt dies nicht für 2-Chlortoluol. Die Versuche in kontinuierlicher Kultur wurden durch die Instabilität der integrierten Genkassette erschwert. Wahrscheinlich wurde, aufgrund dessen, daß die Kassette mit den Chlorbrenzkatechin-Abbaugen den gleichen Resistenzmarker (Kanamycin-Resistenz) enthielt wie die später integrierte 2-Chlorbenzoat Dioxygenase Kassette, entweder die eine oder die andere Kassette unter nicht selektiven Bedingungen, möglicherweise durch Rekombination, eliminiert. Eine Lösung dieses Instabilitätsproblems sollte die Integration der neu entwickelten 2-Chlorbenzoat Dioxygenase Kassette (siehe 3.3.6.), welche als Resistenzmarker eine Tellurit-Resistenz enthält darstellen. Zur Erhaltung der 2-Chlorbenzoat Dioxygenase Genkassette in *Pseudomonas putida* F1AL in kontinuierlicher Kultur wurde der Stamm somit mit einer Mischung aus Chlorbenzol und 2-Chlorbenzoat angezogen. Ein eindeutiger Nachweis, daß 2-Chlortoluol als drittes zugeführtes Substrat mineralisiert wird, konnte nicht erbracht werden. Hingegen konnte die Akkumulation signifikanter Mengen an Muconolacton (entweder aus 2-Chlorbenzoat oder 2-Chlortoluol) beobachtet werden, die aus bisherigen Kenntnissen zur Biochemie und Regulation der metabolischen Wege nicht erklärbar

ist. Aufgrund fehlender Abluftanalytik und der Quantifizierung im Medium gelöster geringer Mengen an Restsubstrat kann eine Bilanzierung nicht erstellt werden. Wie schon erwähnt liegen keine Studien zur Affinität der Abbauenzyme gegenüber Substraten wie 2-Chlortoluol oder Chlorbenzol vor. In kontinuierlicher Kultur mit Substratmischungen können jedoch Hemmeffekte eines Substrates auf den Umsatz des anderen nicht ausgeschlossen werden. Eindeutig ist jedoch das fehlende Wachstum und ein Auswaschen der Kultur selbst bei Verdünnungsraten von 0,015/h.

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß toxische Effekte für ein Absterben der Kultur im Chemostaten ausschlaggebend sind, da eine exakte Regulierung der 2-Chlortoluol-Zufuhr über die Gasphase im Fermenter nicht möglich war. Die Toxizität aromatischer Verbindungen auf Bakterien sowie auf höhere Organismen ist mehrfach beschrieben und bekannt. Hierfür können viele Wirkungsmechanismen diskutiert werden, wie z. B. Permeabilisierung der Membran, Einflüsse auf Stoffwechselaktivitäten oder auf Enzyme, usw. Unabhängig von der Art und Weise, wie diese aromatischen Verbindungen Organismen schädigen, wurden von Bringmann und Kühn (Bringmann und Kühn, 1977) toxische Grenzkonzentrationen (TGK) wassergefährdender Stoffe, u. a. für einen *Pseudomonas putida* Stamm, bestimmt. Die Ermittlung der Stoffkonzentrationen, bei denen das Wachstum beeinträchtigt wurde, erfolgte über einen Vermehrungshemmtest. Die Grenzkonzentrationen wurden in mg/l (gelöst in bidest. Wasser bei einem pH von 7,0) angegeben. Für die in dieser Arbeit relevanten Substrate ermittelten Bringmann und Kühn toxische Grenzkonzentrationen von: 92mg/l Benzol; 29mg/l Toluol; 17mg/l Chlorbenzol; 15mg/l 2-Chlortoluol.

Die Substrate wurden im Rahmen dieser Arbeit über die Gasphase zugefüttert, dabei wurden 6µl auf ein Kulturvolumen von 10ml gegeben (=5mM), was ca. 600mg/l entspräche, wenn diese direkt in das Medium pipettiert würden. Über die Gasphase zugeführt ist die Konzentration geringer.

Chlorbenzol, welches eine TGK von 17mg/l erreicht, wurde ebenfalls (5mM) über die Gasphase zugeführt, und konnte von beiden in dieser Arbeit konstruierten Organismen als Wachstumssubstrat genutzt werden. Somit sollte davon ausgegangen werden, daß 2-Chlortoluol mit einer TGK von 15mg/l in dieser Versuchsanordnung ebenfalls nicht toxisch auf die Organismen wirkt.

Im Chemostaten allerdings war eine genaue Dosierung der Substratzufuhr nicht möglich, so daß die Toxizität von 2-Chlortoluol ein Faktor für das Absterben der Kultur gewesen sein konnte.

Weiterhin ist über Energiebalancen nachzudenken; wieviel beträgt der Energieaufwand, der zur Umsetzung von 2-Chlortoluol gegenüber dem Energiegewinn nötig ist?

Neben Toxizitätsproblemen als Ursache für fehlendes Wachstum ist somit zu berücksichtigen, daß für den Abbau von 2-Chlortoluol die Induktion von vier Abbausegmenten und somit eine energieaufwendige Enzymsynthese zu erfolgen hat. So ist bekannt, daß initiale Oxygenasen einen relativ hohen Anteil an Gesamtprotein aufweisen, z. B. bildet die 4-Sulphobenzoat 3,4-Dioxygenase von *Comamonas testosteroni* T-2 10% des Gesamtproteins (Locher et al., 1991), die Terephthalat 1,2-Dioxygenase im selben Stamm ca. 4% des löslichen Proteins (Schläfli et al., 1994). In Toluol

verwertenden Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* F1 macht die Toluol 2,3-Dioxygenase 7% des Gesamtproteins aus (persönliche Mitteilung L. P. Wackett). Zusätzlich induziert der Stamm den oberen Toluol Abbauweg, inklusive der hier unnötigen Xylol Monooxygenase, und eine 2-Chlorbenzoat Dioxygenase. Betrachtet man somit die notwendige energieaufwendige Enzymsynthese in Relation zum Energiegewinn, so stellt sich die Frage, ob der 2-Chlortoluol-Abbau durch *Pseudomonas putida* F1AL eine energieliefernde Reaktion ist. Entsprechendes könnte jedoch nur durch Modellrechnungen, für die Kenntnisse unbekannter Faktoren, wie Abbaurate der Enzyme, notwendig sind, geklärt werden.

4.4 Ausblick

Bei der Konstruktion eines Organismus, welcher zum Abbau verschiedener Substanzen befähigt sein soll, geht man von schon in diesem Stamm vorhandenen bekannten Abbauwegen aus, und ergänzt diese durch weitere aus anderen Stämmen gewonnene Abbauwege. In dieser Arbeit wurden äußerst gut charakterisierte Ausgangsstämme zur Konstruktion vielfältiger Biokatalysatoren genutzt. Es zeigten sich jedoch im Laufe der Arbeiten neue unerwartete Eigenschaften dieser Stämme, die aufgrund der bearbeiteten Zielsetzung nicht intensiver analysiert werden konnten. Es zeigte sich, daß schon die Ausgangsorganismen aufgrund multipler Abbauwege ein äußerst komplexes System darstellen, welches weiterer Untersuchungen bedarf. So konnten in *Burkholderia (Pseudomonas)* sp. JS150 (Johnson und Olsen, 1997) multiple Abbauwege für den Metabolismus von Brenzkatechin, als Produkt des Abbaus aromatischer Substrate, aufgezeigt werden. Auch für den initialen Angriff an Aromaten wurden multiple Abbauwege postuliert. Neben der ursprünglich für diesen Stamm beschriebenen Toluol Dioxygenase konnten mindestens drei Toluol Monooxygenasen in diesem Stamm nachgewiesen werden (Johnson und Olsen, 1997).

Die Integration des oberen Toluol Abbauweges des TOL Plasmides führte zu Stämmen, die alternative Abbauwege für Toluol aufweisen, in denen für den Abbau von z. B. Chlorbenzol jedoch nur der Dioxygenase-Weg notwendig ist, während für den Abbau von 3-Chlortoluol der Monooxygenase-Weg notwendig ist und der Dioxygenase-Weg unterstützend wirken kann. Interessanterweise induzieren die konstruierten Stämme die jeweils optimalen Abbauweg-Segmente. Zwar sind durchaus Stämme mit multiplen Abbauwegen beschrieben (di Lecce et al., 1997; Johnson und Olsen, 1997), doch beschränken sich Untersuchungen in der Regel auf den Nachweis der entsprechenden genetischen Information, und der Substratfluß in entsprechende Abbauwege so wie das Wechselspiel innerhalb der regulatorischen Systeme wurde bisher höchstens ansatzweise untersucht. Hier gibt es noch deutliche Wissenslücken im Verständnis des mikrobiellen Abbaus

aromatischer Verbindungen. Betrachtet man jedoch allein schon die Komplexität der Regulation des Abbaus von Toluol in *Pseudomonas putida* pWW0 (Ramos et al., 1997), so wird ersichtlich, daß für ein Verständnis der Regulation multipler Abbaupfade und der Wechselwirkungen noch grundlegende Forschungen notwendig sind. Jedoch ermöglicht erst ein solches Verständnis einen zielgerichteten Einsatz von Bakterienrein- und Mischkulturen für den Abbau von Mischsubstraten.

Die beschriebenen Versuche zeigen, daß es möglich ist, durch Kombination multipler Abbausegmente, Stämme mit neuen Substratverwertungseigenschaften zu entwickeln. Teilweise unerwartete Ergebnisse ergeben die Notwendigkeit weiterer Grundlagenforschung. So ist für die Anwendung der zuerst von B. Jakobs (Jakobs, 1997) entwickelten Chlorbrenzkatechin Genkassette eine eindeutige Charakterisierung des TcbR-Proteins und von regulatorischen Mutanten notwendig.

Die Möglichkeit der Mineralisierung von 2-Chlortoluol ist durch Modellrechnungen zu überprüfen. Experimentelle Versuche sind mit einem stabilen Derivat, welches statt der 2-Chlorbenzoat Dioxygenase-Kanamycin-Kassette die 2-Chlorbenzoat Dioxygenase-Tellurit-Kassette enthält, zu reproduzieren. Zudem sollte geprüft werden, ob Stämme, die nur ein partielles oberes Toluol Abbaupfad-Operon enthalten, d. h. keine Xylol Monooxygenase aufweisen, 2-Chlortoluol mineralisieren zu können.

Die Substratspektren der beiden Endkonstrukte bzw. optimierten Derivate sind besonders auf deren Fähigkeiten zum Umsatz höher chlorierter Toluole, wie Di- oder Trichlortoluole, zu untersuchen. Für *Pseudomonas putida* F1AL ist zudem das Spektrum an abbaubaren höher chlorierten Benzolen zu testen und mit dem des Stammes *Burkholderia* sp. PS12AL zu vergleichen. Der Hybridstamm *Pseudomonas* WR1313 (Weisshaar et al., 1987), der aus einer Konjugation zwischen *Pseudomonas putida* F1 und *Pseudomonas* sp. B13 hervorgegangen ist, kann Chlorbenzol verwerten, und WR1323, ein adaptiertes Derivat, ist in der Lage 1,4-Dichlorbenzol zu mineralisieren (Oltmanns et al., 1988). Aufgrund der Spezifität der Chlorbrenzkatechin umsetzenden Enzyme dieses Derivates (Dorn und Knackmuss, 1978b) ist davon auszugehen, daß 1,2-Dichlorbenzol kein Substrat für diesen Stamm darstellt.

Toluol, Benzol und die chlorierten Derivate Chlorbenzol, 1,2-Dichlorbenzol und 1,4-Dichlorbenzol stellen umweltverschmutzende Kontaminanten z. B. des Bitterfelder Grundwasserleiters dar. Viele der in der Literatur beschriebenen Mikroorganismen sind in der Lage, einige dieser Kontaminanten abzubauen, aber in der Regel sind diese Organismen nicht fähig, sämtliche Kontaminanten zu mineralisieren. Daher wäre die Untersuchung von *Pseudomonas putida* F1AL bezüglich der Verwertung von 1,2-Dichlorbenzol und 1,4-Dichlorbenzol interessant. Aufgrund der hohen Aktivität der integrierten Chlorbrenzkatechin 1,2-Dioxygenase mit 3,4-Dichlorbrenzkatechin (van der Meer et al., 1991a) kann vermutet werden, daß auch 1,2-Dichlorbenzol ein Wachstumssubstrat für diesen Organismus darstellt.

Tabelle 42: Abbaufähigkeiten bestimmter Stämme

	Toluol	Benzol	Chlor- benzol	1,2-Dichlor- benzol	1,4-Dichlor- benzol
<i>Burkholderia. sp. PS12</i> (Sander et al., 1991)	+	+	+	+	+
<i>Burkholderia. sp. PSX</i> (P. Rapp, persönliche Mitteilung)	+	-	+	+	+
<i>Pseudomonas. sp. JS100</i> (Haigler et al., 1988)	-	-	+	+	-
<i>Pseudomonas WR1323</i> (Oltmanns et al., 1988)	+	+	+	-	+
<i>Pseudomonas putida F1</i> (Gibson et al., 1968)	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas putida F1AL</i> (diese Arbeit)	+	+	+	n.b.	n.b.
<i>Pseudomonas putida GJ31</i> (Oldenhuis et al., 1989)	+	+	+	-	-
<i>Pseudomonas sp. RH01</i> (Oltmanns et al., 1988)	-	-	+	n.b.	+
<i>Xanthobacter flavus 14p1</i> (Görisch und Sommer, 1997)	n.b.	n.b.	-	n.b.	+

+ Wachstum
 - kein Wachstum
 n.b. nicht bestimmt

Im weiteren Ausblick kann über zusätzliche Integrationen von interessanten Abbaupwegen diskutiert werden. Zum Beispiel würde die Integration einer 4-Chlorbenzoat Dioxygenase in diese Konstrukte die Leitung des 4-Chlortoluols in den unproduktiven Nebenweg zu 4-Chlorbenzoat zu einem erfolgversprechenden Abbaupweg machen und entsprechend eine Verwertung von 4-Chlortoluol über zwei verschiedene Abbaupwege, einen monooxygenolytischen sowie einen dioxygenolytischen, ermöglichen.

Die Integration einer 2-Chlorbenzoat 1,6-Dioxygenase, welche zusätzlich 2-Methylbenzoat in 1,6-Position angreift, an Stelle der in dieser Arbeit genutzten 2-Chlorbenzoat 1,2-Dioxygenase, würde das Substratspektrum der Konstrukte um 2-Methylbenzoat erweitern und somit eine Verwertung von *ortho*-Xylol ermöglichen.

Allerdings ist davon auszugehen, daß die Integration zusätzlicher Genkassetten, die Regulation innerhalb des Organismus komplizierter und unüberschaubarer macht, als es schon der Fall ist. Daher sind weitere Grundlagenforschungen in diesem Bereich unabdingbar.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Konstruktion von Mikroorganismen beschrieben, welche zum Abbau von monochlorierten Toluolen und Chlorbenzylalkoholen befähigt sein sollten. Als Rezipient für Genkassetten diente der Toluol verwertende Stamm *Pseudomonas putida* F1 und der Tetrachlorbenzol-Verwerter *Burkholderia* sp. PS12.

Die Toluol Dioxygenase bzw. Tetrachlorbenzol Dioxygenase katalysieren eine Monooxygenierung von 2- und 3-Chlortoluol zu den entsprechenden Chlorbenzylalkoholen und eine Dioxygenierung von 4-Chlortoluol bzw. Benzol und Chlorbenzolen.

Es wurde gezeigt, daß *Burkholderia* sp. PS12, wie *Pseudomonas putida* F1 über einen Brenzkatechin *meta*-spaltenden Abbauweg verfügt.

In diese Stämme wurden sukzessive die oberen Toluol Abbaugene, der Chlorbrenzkatechin Abbauweg und die 2-Chlorbenzoat Dioxygenase Gene mittels Mini-Tn5-Transposonkassetten in das Chromosom integriert.

Das Derivat *Pseudomonas putida* F1AL, welches diese drei Genkassetten enthält, ist in der Lage 3-Chlortoluol, 2- sowie 3-Chlorbenzylalkohol und Chlorbenzol (nach Mutation) als Wachstumssubstrate zu nutzen. Dieses zeigt die Funktionsfähigkeit sämtlicher Genkassetten.

In 3-Chlortoluol verwertenden Zellen ist der neu integrierte obere Toluol Abbauweg hochaktiv, die Monooxygenierung von 3-Chlortoluol erfolgt somit primär durch die in den Stamm integrierte Xylol Monooxygenase des oberen Toluol Abbauges. Der gebildete 3-Chlorbenzylalkohol wird durch die ebenfalls dem oberen Toluol Abbauweg entstammende Benzylalkohol Dehydrogenase und folgende Benzaldehyd Dehydrogenase dehydrogeniert. Intermediäres 3-Chlorbenzoat wird durch eine dem Stamm eigene Dioxygenase mit folgender Dehydrogenase zu Chlorbrenzkatechinen umgesetzt, welche einer Dioxygenierung durch die in den Stamm integrierte Chlorbrenzkatechin 1,2-Dioxygenase und weiterer Mineralisierung durch die Folgeenzyme dieses Abbauges unterliegen.

Im Gegensatz dazu ist in Toluol verwertenden Zellen primär der dioxygenolytische Abbauweg aktiv, so daß davon auszugehen ist, daß nur ein geringer Teil des Substrates über das monooxygenolytische Segment mineralisiert wird.

2-Chlorbenzylalkohol als Wachstumssubstrat des Derivates *Pseudomonas putida* F1AL wird durch die Dehydrogenasen des integrierten oberen Toluol Abbauges zu 2-Chlorbenzoat dehydrogeniert, welches einer Dioxygenierung durch die ebenfalls ins Genom integrierte 2-Chlorbenzoat 1,2-Dioxygenase zu Brenzkatechin und kompletter Mineralisierung durch den 3-Oxadipat-Abbauweg unterliegt.

2-Chlortoluol dient nicht als Wachstumssubstrat für *Pseudomonas putida* F1AL, kann aber als Kosubstrat verstoffwechselt werden, indem die initiale Monooxygenierung der Methylgruppe durch die Toluol 2,3-Dioxygenase katalysiert, und der gebildete 2-Chlorbenzylalkohol wie beschrieben mineralisiert wird.

4-Chlortoluol stellt kein Wachstumssubstrat dar, da von einem „misrouting“ durch die im oberen Toluol Abbauweg kodierten Enzyme Xylol Monooxygenase, Benzylalkohol Dehydrogenase und Benzaldehyd Dehydrogenase zum „dead-end“ Metaboliten 4-Chlorbenzoat ausgegangen werden muß.

Das Endkonstrukt *Burkholderia* sp. PS12AL, welches die oberen Toluol Abbaugene, sowie die 2-Chlorbenzoat Dioxygenase Gene enthält, kann 2- und 3-Chlorbenzylalkohol als Wachstumssubstrate nutzen.

2-Chlorbenzylalkohol wird, wie auch für *Pseudomonas putida* F1AL beschrieben, durch die Benzylalkohol Dehydrogenase und Benzaldehyd Dehydrogenase des oberen Toluol Abbauweges zu 2-Chlorbenzoat dehydrogeniert, welches einer Dioxygenierung durch die 2-Chlorbenzoat 1,2-Dioxygenase zu Brenzkatechin und folgender Mineralisierung unterliegt.

3-Chlorbenzylalkohol wird durch *Burkholderia* sp. PS12AL ebenfalls analog dem Mechanismus durch *Pseudomonas putida* F1AL abgebaut, wobei im unteren Abbauweg die dem Stamm eigene Chlorbrenzkatechin 1,2-Dioxygenase die *ortho*-Spaltung des Chlorbrenzkatechins katalysiert.

3-Chlortoluol, welches durch *Burkholderia* sp. PS12AL nicht verwertet wird, kann als Kosubstrat verstoffwechselt werden, indem eine initiale Monooxygenierung, katalysiert durch die konstitutiv exprimierte Tetrachlorbenzol Dioxygenase, zur Bildung von 3-Chlorbenzylalkohol führt, welches dem Stamm als Wachstumssubstrat dient. Eine Monooxygenierung von 3-Chlortoluol durch die integrierte Xylol Monooxygenase des oberen Toluol Abbauweges konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Verwertung von Toluol beschränkt sich in diesem Derivat auf den dioxygenolytischen Abbauweg, initial katalysiert durch die Tetrachlorbenzol Dioxygenase. Der monooxygenolytische Abbauweg ist in diesem Fall, aufgrund der wahrscheinlich im Konstrukt nicht funktionstüchtigen Xylol Monooxygenase, auszuschließen.

2-Chlortoluol, welches durch *Burkholderia* sp. PS12AL ebenfalls nicht verwertet wird, unterliegt in diesem Stamm der bei *Pseudomonas putida* F1AL beschriebenen Kometabolisierung, wobei als initiales Enzym in diesem Stamm die Tetrachlorbenzol Dioxygenase die Methylgruppe monooxygeniert, und im unteren Abbau eine *meta*- oder *ortho*-Spaltung des Brenzkatechins erfolgen kann.

Für 4-Chlortoluol kann ein vollständiger Abbau mit initialer Dioxygenierung, katalysiert durch die Tetrachlorbenzol Dioxygenase, Dehydrogenierung und anschließender *ortho*-Spaltung des 3-Chlor-6-methylbrenzkatechins mit sukzessiver Mineralisierung angenommen werden.

6 Abkürzungen

AE	Absorptionseinheiten
Ap	Ampicillin
<i>B</i>	<i>Burkholderia</i>
BSA	Rinderserumalbumin
BTX	Benzol, Toluol, Xylol
Cm	Chloramphenicol
d	Verdopplungszeit [h]
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
E.C.	Enzyme Collection
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPA	US Environmental Protection Agency
F1	<i>Pseudomonas putida</i> F1
HMN	Heptamethylnonan
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatograph(ie)
inkl.	inklusive
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
Kb	Kilobasen
Km	Kanamycin
λ	optische Wellenlänge [nm]
LB	Luria Bertani-Medium
μ	Wachstumsrate [h^{-1}]
<i>m</i> -	<i>meta</i> -
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
NAD(H)	Nicotinamidadenindinucleotid
n. b.	nicht bestimmt
<i>o</i> -	<i>ortho</i> -
OD	optische Dichte
<i>orf</i>	open reading frame, offener Leserahmen
<i>p</i> -	<i>para</i> -
PCB	polychlorierte Biphenyle
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pip	Piperacillin
<i>Pp</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
PS12	<i>Burkholderia</i> sp. PS12

Rf	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Sm	Streptomycin
sp.	species
Tec	Tetracyclin
Tel	Kaliumtellurit
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	units, internationale Enzymeinheit [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$]
UV	ultraviolett
Vol	Volumen
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galctosid
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

7 Literatur

Abbott, B. J. and W. E. Gledhill (1971). The extracellular accumulation of metabolic products by hydrocarbon degrading microorganisms. *Advan. Appl. Microbiol.* **14**: 249-388.

Abril, M.-A., C. Michan, K. N. Timmis and J. L. Ramos (1989). Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J. Bacteriol.* **171**: 6782-6790.

Alexander, M. and B. K. Lustigmann (1966). Effect of chemical structure on microbial degradation of substituted benzenes. *J. Agric. Food. Chem.* **14**: 410-413.

Alvarez, P. J. J. and T. M. Vogel (1991). Substrate interactions of benzene, toluene, and *para*-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2981-2985.

Arendorf, J. J. and D. D. Focht (1994). Formation of chlorocatechol *meta*-cleavage products by a *Pseudomonas* during metabolism of monochlorobiphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2884-2889.

Arendorf, J. J. and D. D. Focht (1995). A *meta*-cleavage pathway for 4-chlorobenzoate, an intermediate in the metabolism of 4-chlorobiphenyl by *Pseudomonas cepacia* P166. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 443-447.

Armengaud, J., B. Happe and K. N. Timmis (1998). Genetic analysis of dioxin dioxygenase of *Sphingomonas* sp. RW1: catabolic genes dispersed on the genome. submitted.

Assinder, S. J. and P. A. Williams (1990). The TOL plasmids: Determinants of the catabolism of toluene and the xylenes. *Adv. Microb. Physiol.* **31**: 1-69.

Asturias, J. A. and K. N. Timmis (1993). Three different 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase genes in the gram-positive polychlorobiphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus globerulus* P6. *J. Bacteriol.* **175**: 4631-4640.

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl (1994). Current protocols in molecular biology. New York, John Wiley & Sons Inc.

Axell, B. C. and P. J. Geary (1975). The metabolism of benzene by bacteria. *Biochem. J.* **136**: 927-934.

Barbieri, P., L. Palladino, P. Di Gennaro and E. Galli (1993). Alternative pathways for *o*-xylene or *m*-xylene degradation in a *Pseudomonas stutzeri* strain. *Biodegradation* **4**: 71-80.

Barnsley, E. A. (1976). The induction of the enzymes of naphthalene metabolism in *Pseudomonads* by salicylate and 2-aminobenzoate. *J. Gen. Microbiol.* **88**: 193-196.

Bartels, I., H.-J. Knackmuss and W. Reineke (1984). Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechols. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 500-505.

Beil, S., B. Happe, K. N. Timmis and D. H. Pieper (1997). Genetic and biochemical characterization of the broad spectrum chlorobenzene dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain PS12. Dechlorination of 1,2,4,5-tetrachlorobenzene. *Eur. J. Biochem.* **247**: 190-199.

Benson, S. and J. Shapiro (1978). TOL is a broad-host-range plasmid. *J. Bacteriol.* **135**: 278-280.

Bertoni, G., F. Bolognese, E. Galli and P. Barbieri (1996). Cloning of the genes for and characterization of the early stages of toluene and *o*-xylene catabolism in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3704-3711.

Blasco, R., R.-M. Wittich, M. Mallavarapu, K. N. Timmis and D. H. Pieper (1995). From xenobiotic to antibiotic, formation of protoanemonin from 4-chlorocatechol by enzymes of the 3-oxoadipate pathway. *J. Biol. Chem.* **270**: 29229-29235.

Boyer, H. and D. Roulland-Dussoix (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**: 459-472.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Bringmann, G. and R. Kühn (1977). Grenzwerte der Schadwirkung wassergefährdender Stoffe gegen Bakterien (*Pseudomonas putida*) und Grünalgen (*Scenedesmus quadricauda*) im Zellvermehrungshemmtest. *Z. Wasser Abwasser Forsch.* **10**: 87-98.

Brinkmann, U. and W. Reineke (1992). Degradation of chlorotoluenes by *in vivo* constructed hybrid strains: problems of enzyme specificity, induction and prevention of *meta*-pathway. *FEMS Microbiol. Lett.* **1992**: 81-88.

Brinkmann, U., J. L. Ramos and W. Reineke (1994). Loss of the TOL *meta*-cleavage pathway functions of *Pseudomonas putida* strain Pa W1 (pWW0) during growth on toluene. J. Basic Microbiol. **34**: 303-309.

Bruce, N. C. and R. B. Cain (1988). β -Methylmuconolactone, a key intermediate in the dissimilation of methylaromatic compounds by a modified 3-oxoadipate pathway in nocardioform actinomycetes. FEMS Microbiol. Lett. **50**: 233-239.

Bruce, N. C., R. B. Cain, D. H. Pieper and K.-H. Engesser (1989). Purification and characterization of 4-methylmuconolactone methyl-isomerase, a novel enzyme of the modified 3-oxoadipate pathway in nocardioform actinomycetes. Biochem. J. **262**: 303-312.

Cases, I., V. de Lorenzo and J. Pérez-Martín (1996). Involvement of σ^{54} in exponential silencing of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid *Pu* promoter. Mol. Microbiol. **19**: 7-17.

Catelani, D., A. Fiecchi and E. Galli (1971). (+)- γ -carboxymethyl- γ -methyl- Δ^a -butenolide, a 1,2-ring-fission product of 4-methylcatechol by *Pseudomonas desmolyticum*. Biochemistry **121**: 89-92.

Cebolla, A., C. Sousa and V. de Lorenzo (1997). Effector specificity mutants of the transcriptional activator NahR of naphthalene degrading *Pseudomonas* define protein sites involved in binding of aromatic inducers. J. Biol. Chem. **272**: 3986-3992.

Chatterjee, D. K., S. T. Kellogg, S. Hamada and A. M. Chakrabarty (1981). Plasmid specifying total degradation of 3-chlorobenzoate by a modified *ortho* pathway. J. Bacteriol. **146**: 639-646.

Chaudhry, G. R. and S. Chapalmadugu (1991). Biodegradation of halogenated aromatic compounds. Microbiol. Rev. **55**: 59-79.

Chiang, C. Y., J. P. Salanitro, E. T. Chai, J. D. Colthart and C. L. Klein (1989). Aerobic biodegradation of benzene, toluene, and xylene in a sandy aquifer-data analysis and computer modeling. Ground Water **27**: 823-834.

Davey, J. F. and D. T. Gibson (1974). Bacterial metabolism of *para*- and *meta*-xylene: Oxidation of a methyl substituent. J. Bacteriol. **119**: 923-929.

Davis, R. S., F. E. Hossler and R. W. Stone (1968). Metabolism of *p*- and *m*-xylene by species of *Pseudomonas*. Can. J. Microbiol. **14**: 1005-1009.

de Bont, J. A. M., M. J. A. W. Vorage, S. Hartmans and W. J. J. van den Tweel (1986). Microbial degradation of 1,3-dichlorobenzene. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 677-680.

de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik and K. N. Timmis (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promotor probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6568-6572.

de Lorenzo, V. and K. N. Timmis (1994). Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5 and Tn10-derived mini-transposons. *Meth. Enzymol.* **235**: 386-405.

Delgado, A., R. Salto, S. Marques and J. L. Ramos (1995). Single amino acids changes in the signal receptor domain of XylR resulted in mutants that stimulate transcription in the absence of effectors. *J. Biol. Chem.* **270**: 5144-5150.

di Lecce, C., M. Accarino, F. Bolognese, E. Galli and P. Barbieri (1997). Isolation and metabolic characterization of a *Pseudomonas stutzeri* mutant able to grow on the three isomers of xylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3279-3281.

Dorn, E. and H.-J. Knackmuss (1978a). Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Two catechol 1,2-dioxygenase from a 3-chlorobenzoate-grown *Pseudomonad*. *Biochem. J.* **174**: 73-84.

Dorn, E. and H.-J. Knackmuss (1978b). Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Substituent effects on 1,2-dioxygenation of catechol. *Biochem. J.* **174**: 85-94.

Drotleff, J., A. Fluthwedel, H. Pohle and K. Spilok *Handbuch Chlorchemie II*
Ausgewählte Produktlinien, Umweltbundesamt.

Duetz, W. A., C. de Jong, P. A. Williams and J. G. van Andel (1994a). Competition in chemostat culture between *Pseudomonas* strains that use different pathways for the degradation of toluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2858-2863.

Duetz, W. A., S. Marqués, C. de Jong, J. L. Ramos and J. G. van Andel (1994b). Inducibility of the TOL catabolic pathway in *Pseudomonas putida* (pWW0) growing on succinate in continuous culture: evidence of carbon catabolite repression control. *J. Bacteriol.* **176**: 2354-2361.

- Duetz, W. A., S. Marques, B. Wind, J. L. Ramos and J. G. van Andel** (1996). Catabolite repression of the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* harbouring pWW0 under various conditions of nutrient limitation in chemostat culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 601-606.
- Eaton, R. W.** (1997). *p*-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: Cloning and characterization of DNA encoding conversion of *p*-Cymene to *p*-Cumate. *J. Bacteriol.* **179**: 3171-3180.
- Engelberts, K., E. Schmidt and W. Reineke** (1989). Degradation of *o*-toluate by *Pseudomonas* sp. strain WR401. *FEMS Microbiol. Lett.* **59**: 35-38.
- Engesser, K. H. and P. Schulte** (1989). Degradation of 2-bromo-, 2-chloro- and 2-fluorobenzoate by *Pseudomonas putida* CLB 250. *FEMS Microbiol. Lett.* **60**: 143-148.
- Erb, R. W., C. A. Eichner, I. Wagner-Döbler and K. N. Timmis** (1997). Bioprotection of microbial communities from toxic phenol mixtures by a genetically designed pseudomonad. *Nat. Biotechnol.* **15**: 378-382.
- Fetzner, S., R. Müller and F. Lingens** (1989). Degradation of 2-chlorobenzoate by *Pseudomonas cepacia* 2CBS. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **370**: 1173-1182.
- Fetzner, S., R. Müller and F. Lingens** (1992). Purification and some properties of 2-halobenzoate 1,2-dioxygenase, a two-component enzyme system from *Pseudomonas cepacia* 2CBS. *J. Bacteriol.* **174**: 279-290.
- Fong, K. P. Y., C. B. H. Goh and H.-M. Tan** (1996). Characterization and expression of the plasmid-borne *bedD* gene from *Pseudomonas putida* ML2, which encodes for a NAD⁺-dependent *cis*-benzene dihydrodiol dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **178**: 5592-5601.
- Franklin, F. C., P. R. Lehrbach, R. Lurz, B. Rueckert, M. Bagdasarian and K. N. Timmis** (1983). Localization and functional analysis of transposon mutations in regulatory genes of the TOL catabolic pathway. *J. Bacteriol.* **154**: 676-685.
- Furukawa, K., J. Hirose, A. Suyama, T. Zaiki and S. Hayashida** (1993). Gene components responsible for discrete substrate specificity in the metabolism of biphenyl (*bph* operon) and toluene (*tod* operon). *J. Bacteriol.* **175**: 224-5232.

- Gaunt, J. K. and W. C. Evans** (1971a). Metabolism of 4-chloro-2-methylphenoxyacetate by a soil pseudomonad. Preliminary evidence for the metabolic pathway. *Biochem. J.* **122**: 519-526.
- Gaunt, J. K. and W. C. Evans** (1971b). Metabolism of 4-chloro-2-methylphenoxyacetate by a soil pseudomonad. Ring-fission, lactonizing and delactonizing enzymes. *Biochem. J.* **122**: 533-542.
- Gibson, D. T., J. R. Koch and R. E. Kallio** (1968). Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymatic formation of catechol from benzene. *Biochemistry* **7**: 2653-2662.
- Gibson, D. T., G. E. Cardini, F. C. Maesels and R. E. Kallio** (1970a). Incorporation of ^{18}O into benzene. *Biochemistry* **9**: 1631-1635.
- Gibson, D. T., B. Gschwendt, W. K. Yeh and V. M. Kobal** (1970b). Initial reactions in the oxidation of ethylbenzene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* **12**: 1520-1528.
- Gibson, D. T., M. Hensley, H. Yoshioka and T. J. Mabry** (1970c). Formation of (+)-*cis*-2,3-dihydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-diene from toluene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* **9**: 1626-1630.
- Gibson, D. T., V. Mahadevan and J. F. Davey** (1974). Bacterial metabolism of *para*- and *meta*-xylene: oxidation of the aromatic ring. *J. Bacteriol.* **119**: 930-936.
- Görisch, H. and C. Sommer** (1997). Enzymology of the degradation of (di)chlorobenzenes by *Xanthobacter flavus* 14p1. *Arch. Microbiol.* **167**: 384-391.
- Haak, B., S. Fetzner and F. Lingens** (1995). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the plasmid-encoded genes for the two-component 2-halobenzoate-1,2-dioxygenase from *Pseudomonas cepacia*. *J. Bacteriol.* **177**: 667-675.
- Haigler, B. E., S. F. Nishino and J. C. Spain** (1988). Degradation of 1,2-dichlorobenzene by *Pseudomonas* sp.. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 294-301.
- Haigler, B. E. and J. C. Spain** (1989). Degradation of *p*-chlorotoluene by a mutant of *Pseudomonas* sp. strain JS6. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 372-379.
- Haigler, B. E., C. A. Pettigrew and J. C. Spain** (1992). Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2237-2244.

- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**: 557-580.
- Happe, B., L. D. Eltis, H. Poth, R. Hedderich and K. N. Timmis** (1993). Characterization of 2,2',3-trihydroxybiphenyl dioxygenase, an extradiol dioxygenase from the dibenzofuran- and dibenzo-*p*-dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas* sp. strain RW1. J. Bacteriol. **175**: 7313-7320.
- Harayama, S., P. R. Lehrbach and K. N. Timmis** (1984). Transposon mutagenesis analysis of the *meta*-cleavage pathway operon genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. J. Bacteriol. **160**: 251-255.
- Harayama, S., R. A. Leppik, M. Rekik, N. Mermoud, P. R. Lehrbach, W. Reineke and K. N. Timmis** (1986). Gene order of the TOL catabolic plasmid upper pathway operon and oxidation of both toluene and benzyl alcohol by the *xyIA* product. J. Bacteriol. **167**: 455-461.
- Harayama, S., M. Rekik and K. N. Timmis** (1986). Genetic analysis of a relaxed substrate specificity aromatic ring dioxygenase, toluate 1,2-dioxygenase, encoded by TOL plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida*. Mol. Gen. Genet. **202**: 226-234.
- Harayama, S., M. Rekik, M. Wubbolts, K. Rose, R. A. Leppik and K. N. Timmis** (1989). Characterization of five genes in the upper-pathway operon of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and identification of the gene products. J. Bacteriol. **171**: 5048-5055.
- Harayama, S.** (1994). Codon usage patterns suggest independent evolution of the two catabolic operons on toluene-degradative plasmid TOL pWW0 of *Pseudomonas putida*. J. Mol. Evol. **38**: 328-335.
- Hartmann, J., K. Engelberts, B. Nordhaus, E. Schmidt and W. Reineke** (1989). Degradation of 2-chlorobenzoate by *in vivo* constructed hybrid pseudomonads. FEMS Microbiol. Lett. **61**: 17-22.
- Hauschild, J. E., E. Masai, K. Sugiyama, T. Hatta, K. Kimbara, M. Fukuda and K. Yano** (1996). Identification of an alternative 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase in *Rhodococcus* sp. strain RHA1 and cloning of the gene. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 2940-2946.
- Hegemann, G. D.** (1966). Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. **91**: 1140-1154.

Heiss, G., C. Müller, J. Altenbuchner and A. Stolz (1997). Analysis of a new dimeric extradiol dioxygenase from a naphthalenesulfonate degrading sphingomonad. *Microbiology* **143**: 1691-1699.

Henikoff, S., G. W. Haughn, J. M. Calvo and J. C. Wallace (1988). A large family of bacterial activator proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 6602-6606.

Herrero, M., V. de Lorenzo and K. N. Timmis (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6557-6567.

Högn, T. and L. Jaenicke (1972). Benzene metabolism of *Moraxella* sp. *Eur. J. Biochem.* **30**: 369-375.

Holtel, A., S. Marqués, I. Möhler, U. Jakubzik and K. N. Timmis (1994). Carbon source-dependent inhibition of *xyl* operon expression of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **176**: 1773-1776.

Hughes, K., M. E. Meek and S. Bartlett (1994). Benzene: Evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. *Environ. Carcino. & Ecotox. Revs.* **C12**: 161-171.

Inoue, J., J. P. Shaw, M. Rekik and S. Harayama (1995). Overlapping substrate specificities of benzaldehyde dehydrogenase (the *xylC* gene product) and 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase (the *xylG* gene product) encoded by TOL plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **177**: 1196-1201.

Ish-Horowicz, D. and J. F. Burke (1981). Rapid and efficient cosmid vector cloning. *Gene* **70**: 191-197.

Jakobs, B. (1997). Doktorarbeit, TU Braunschweig.

Jeenes, D. J., W. Reineke, H.-J. Knackmuss and P. A. Williams (1982). TOL plasmid pWW0 in constructed halobenzoate-degrading *Pseudomonas* strains: enzyme regulation and DNA structure. *J. Bacteriol.* **150**: 180-187.

Johnson, G. R. and R. H. Olsen (1997). Multiple pathways for toluene degradation in *Burkholderia* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4047-4052.

Kaphammer, B., J. J. Kukor and R. H. Olsen (1990). Cloning and characterization of a novel toluene degrading pathway from *Pseudomonas pickettii* PK01. 90th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Washington, D. C., American Society of Microbiology.

Kaschabek, S. R., T. Kasberg, D. Müller, A. E. Mars, D. B. Janssen and W. Reineke (1998). Degradation of chloroaromatics: purification and characterization of a novel type of chlorocatechol 2,3-dioxygenase of *Pseudomonas putida* GJ31. J. Bacteriol. **180**: 296-302.

Kessler, B., V. de Lorenzo and K. N. Timmis (1992). A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the *Pm* promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. Mol Gen Genet **233**: 293-301.

Kitayama, A., T. Achioku, T. Yanagawa, K. Kanou, M. Kikuchi, H. Ueda, E. Suzuki, H. Nishimura, T. Nagamune and Y. Kawakami (1996). Cloning and characterization of extradiol aromatic ring-cleavage dioxygenases of *Pseudomonas aeruginosa* JI104. J. Ferment. Bioeng. **82**: 217-223.

Klecka, G. M. and D. T. Gibson (1981). Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol. Appl. Environ. Microbiol. **41**: 1159-1165.

Knackmuss, H.-J., M. Hellwig, H. Lackner and W. Otting (1976). Cometabolism of 3-methylbenzoate and methylcatechols by a 3-chlorbenzoate utilizing *Pseudomonas*: Accumulation of (+)-2,5-dihydro-4-methyl- and (+)-2,5-dihydro-2-methyl-5-oxo-furan-2-acetic acid. Eur. J. Appl. Microbiol. **2**: 267-276.

Knackmuss, H.-J. (1979). Halogenierte und sulfonierte Aromaten - Eine Herausforderung für Aromaten abbauende Bakterien. Forum Mikrobiologie: 311-317.

Knackmuss, H.-J. (1980). Degradation of halogenated and sulfonated carbons. Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds. T. Leisinger and A. M. Cook, R. Hütter & Nuesch, Academic Press: 189-212.

Knackmuss, H.-J. (1983a). Xenobiotic degradation of industrial sewage: haloaromatics as target substrates. Biochem. Soc. Symp. **48**: 173-190.

Knackmuss, H.-J. (1983b). Biochemistry and practical implications of organohalide degradation. 3rd Inter. Symposium on Microbial Ecology, Michigan State University, Am. Soc. Microbiol.

Knackmuss, H.-J. (1984). Biochemistry and practical implications of organohalide degradation. Current Perspectives in Microbial Ecology. M. J. Klug and C. A. R. e. ASM. Washington: 687-693.

Kosono, S., M. Maeda, F. Fuji, H. Arai and T. Kudo (1997). Three of the seven *bphC* genes of *Rhodococcus erythropolis* TA421, isolated from a termite ecosystem, are located on an indigenous plasmid associated with biphenyl degradation. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 3282-3285.

Kristensen, C. S., L. Eberl, J. M. Sanchez-Romero, M. Givskov, S. Molin and V. de Lorenzo (1995). Site-specific deletions of chromosomally located DNA segments with the multimer resolution system of broad-host-range plasmid RP4. J. Bacteriol. **177**: 52-58.

Kukor, J. J. and R. H. Olsen (1991). Genetic organization and regulation of a *meta*-cleavage pathway for catechols produced from catabolism of toluene, benzene, phenol, and cresols by *Pseudomonas pickettii* PK01. J. Bacteriol. **173**: 4587-4594.

Lau, P. C. K., Y. Wang, A. Patel, D. Labbé, H. Bergeron, R. Brousseau, Y. Konishi and M. Rawlings (1997). A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 1453-1458.

Lee, J.-Y., K.-H. Jung and H.-S. Kim (1994). Amplification of toluene dioxygenase genes in a hybrid *Pseudomonas* strain to enhance the biodegradation of benzene, toluene and *p*-xylene mixture. Biotechnol. Bioeng. **45**: 488-494.

Lee, J.-Y., K.-H. Jung, S. H. Choi and H.-S. Kim (1995). Combination of the *tod* and *tol* pathways in redesigning a metabolic route of *Pseudomonas putida* for the mineralization of a benzene, toluene and *p*-xylene mixture. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 2211-2217.

Lehning, A., U. Fock, R.-M. Wittich, K. N. Timmis and D. H. Pieper (1997). Metabolism of chlorotoluenes by *Burkholderia* sp. strain PS12 and toluene dioxygenase of *Pseudomonas putida* F1: Evidence for monooxygenation by toluene and chlorobenzene dioxygenase. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 1974-1979.

Leisinger, T. (1983). Microorganisms and xenobiotic compounds. Experientia **39**: 1183-1191.

Lim, H. K., J. Y. Lee and H. S. Kim (1994). Cometabolism in the biodegradation of benzene, toluene, and *p*-xylene mixture by isolated *Pseudomonas fluorescence* BE103. J. Microbiol. Biotechnol. **4**: 63-67.

- Locher, H. H., T. Leisinger and A. M. Cook** (1991). 4-Sulphobenzoate 3,4-dioxygenase. Purification and properties of a desulphonative two-component enzyme system from *Comamonas testosteroni* T-2. *Biochem. J.* **274**: 833-842.
- Maltseva, O. V., I. P. Solyanikova, L. A. Golovleva, M. Schlömann and H.-J. Knackmuss** (1994). Dienlactone hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* 1 CP: purification and properties. *Arch. Microbiol.* **162**: 368-374.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mars, A. E., T. Kasberg, S. R. Kaschabek, M. H. van Agteren, D. B. Janssen and W. Reineke** (1997). Microbial degradation of chloroaromatics: use of the *meta*-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene. *J. Bacteriol.* **179**: 4530-4537.
- Masai, E., K. Sugiyama, N. Iwashita, S. Shimizu, J. E. Hauschild, T. Hatta, K. Kimbara, K. Yano and M. Fukuda** (1997). The *bphDEF meta*-cleavage pathway genes involved in biphenyl/polychlorinated biphenyl degradation are located on a linear plasmid and separated from the initial *bphACB* genes in *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Gene* **187**: 141-149.
- Mason, J. R. and R. Cammack** (1992). The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 277-305.
- Mason, J. R.** (1994). The induction and repression of benzene and catechol oxidizing capacity of *Pseudomonas putida* ML2 in perturbed chemostat culture. *Arch. Microbiol.* **162**: 57-62.
- McFall, S. M., M. R. Parsek and A. M. Chakrabarty** (1997). 2-Chloromuconate and ClcR-mediated activation of the *clcABD* operon: *In vitro* transcriptional and DNase footprint analyses. *J. Bacteriol.* **179**: 3655-3663.
- McKay, D. B., M. Seeger, M. Zielinski, B. Hofer and K. N. Timmis** (1997). Heterologous expression of biphenyl dioxygenase-encoding genes from a gram-positive broad-spectrum polychlorinated biphenyl degrader and characterization of chlorobiphenyl oxidation by the gene products. *J. Bacteriol.* **179**: 1924-1930.
- Müller, R. and F. Lingens, Eds.** (1983). Oxygenation pathways in bacteria. Biological Oxidations. Berlin, Springer Verlag.

- Müller, R.** (1992). Bacterial degradation of xenobiotics. *Microbiol. Control. Pollut.*: 35-57.
- Murray, K., C. J. Duggleby, J. M. Sala-Trepat and P. A. Williams** (1972). The metabolism of benzoate and methylbenzoates via the *meta*-cleavage pathway by *Pseudomonas arvilla* mt-2. *Eur. J. Biochem.* **28**: 301-310.
- Nakazawa, T. and T. Yokota** (1973). Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2: Demonstration of two benzoate pathways. *J. Bacteriol.* **115**: 262-267.
- Newman, L. M. and L. P. Wackett** (1995). Purification and characterization of toluene 2-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* G4. *Biochemistry* **34**: 14066-14076.
- Nozaki, M.** (1973). Metapyrocatechase (*Pseudomonas*). *Meth. Enzymol.* **17A**: 522-525.
- Oh, Y. S., Z. Shareefdeen, B. C. Baltzis and R. Bartha** (1994). Interactions between benzene, toluene, and *p*-xylene (BTX) during their biodegradation. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 533-538.
- Oldenhuis, R., L. Kuijk, A. Lammers, D. B. Janssen and B. Witholt** (1989). Degradation of chlorinated and non-chlorinated aromatic solvents in soil suspensions by pure bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 211-217.
- Olsen, R. H., J. J. Kukor and B. Kaphammer** (1994). A novel toluene 3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PK01. *J. Bacteriol.* **176**: 3749-3756.
- Oltmanns, R. H., H. G. Rast and W. Reineke** (1988). Degradation of 1,4-dichlorobenzene by enriched and constructed bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 609-616.
- Ornston, L. N.** (1966). The conversion of catechol and protocatechuate to β -ketoadipate by *Pseudomonas putida*. II. Enzymes of the protocatechuate pathway. *J. Biol. Chem.* **241**: 3787-3794.
- Panke, S.** (1995). Diplomarbeit, TU Braunschweig.
- Panke, S., J. M. Sánchez-Romero and V. de Lorenzo** (1998). Engineering of quasi-natural *Pseudomonas putida* strains for toluene metabolism through an *ortho*-cleavage degradation pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 748-751.

Parsek, M. R., D. L. Shinabarger, R. K. Rothmel and A. M. Chakrabarty (1992). Roles of CatR and *cis,cis*-muconate in activation of the *catBC* operon, which is involved in benzoate degradation in *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. **174**: 7798-7806.

Patel, T. R. and D. T. Gibson (1976). Bacterial *cis*-dihydrodiol dehydrogenases: Comparison of physicochemical and immunological properties. J. Bacteriol. **128**: 842-850.

Pearson, C. R., Ed. (1982). Halogenated aromatics. The handbook of environmental chemistry, anthropogenic compounds. New York / Berlin / Heidelberg, Springer Verlag.

Pettigrew, C. A., B. E. Haigler and J. C. Spain (1991). Simultaneous biodegradation of chlorobenzene and toluene by a *Pseudomonas* strain. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 157-162.

Pieper, D. H., K.-H. Engesser, K. N. Timmis and H.-J. Knackmuss (1985). Modified *ortho*-cleavage pathway in *Alcaligenes eutrophus* JMP134 for the degradation of 4-methylcatechol. FEMS Microbiol. Lett. **29**: 63-67.

Pieper, D. H., K. Stadler-Fritzsche, H.-J. Knackmuss, K.-H. Engesser, N. C. Bruce and R. B. Cain (1990). Purification and characterization of 4-methylmuconolactone methylisomerase, a novel enzyme of the modified 3-oxoadipate pathway in the gram-negative bacterium *Alcaligenes eutrophus* JMP134. Biochem. J. **271**: 529-534.

Pieper, D. H., H.-J. Knackmuss and K. N. Timmis (1993). Accumulation of 2-chloromuconate during metabolism of 3-chlorobenzoate by *Alcaligenes eutrophus* JMP134. Appl. Microbiol. Biotechnol. **39**: 563-567.

Pieper, D. H., K. Stadler-Fritzsche, K.-H. Engesser and H.-J. Knackmuss (1993). Metabolism of 2-chloro-4-methylphenoxyacetate by *Alcaligenes eutrophus* JMP134. Arch. Microbiol. **160**: 169-178.

Pieper, D. H., K. Stadler-Fritzsche, H.-J. Knackmuss and K. N. Timmis (1995). Formation of Dimethylmuconolactones from Dimethylphenols by *Alcaligenes eutrophus* JMP 134. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 2159-2165.

Pitter, P. (1976). Determination of biological degradability of organic substances. Water Res. **10**: 231-253.

Prucha, M., V. Wray and D. H. Pieper (1996). Metabolism of 5-chlorosubstituted muconolactones. Eur. J. Biochem. **237**: 357-366.

Ramos, J. L., S. Marqués and K. N. Timmis (1997). Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of the host factors and plasmid-encoded regulators. *Annu. Rev. Rev. Microbiol.* **51**: 341-373.

Ramos-Gonzalez, M.-I., E. Duque and J. L. Ramos (1991). Conjugal transfer of recombinant DNA in cultures and in soils: Host range of *Pseudomonas putida* TOL plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3020-3027.

Reineke, W. and H.-J. Knackmuss (1978a). Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Substituent effects on the 1,2-dioxygenation of benzoic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **542**: 412-423.

Reineke, W. and H.-J. Knackmuss (1978b). Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Substituent effects on dehydrogenation of 3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carboxylic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **542**: 424-4429.

Reineke, W., D. J. Jeenes, P. A. Williams and H.-J. Knackmuss (1982). TOL plasmid pWW0 in constructed halobenzoate-degrading *Pseudomonas* strains: prevention in *meta* pathway. *J. Bacteriol.* **150**: 195-201.

Reineke, W. and H.-J. Knackmuss (1984). Microbial metabolism of haloaromatics: isolation and properties of a chlorobenzene degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 395-402.

Reiner, A. M. (1972). Metabolism of aromatic compounds in bacteria. Purification and properties of the catechol-forming enzyme 3,4-cyclohexadien-1,2-diol-1-carboxylic acid (NAD⁺) oxidoreductase (decarboxylating). *J. Biol. Chem.* **247**: 4960-4965.

Richardson, K. L. and D. T. Gibson (1984). A novel pathway for toluene oxidation in *Pseudomonas mendocina*. 84th Annual Meeting of the American Society of Microbiology, Washington, D. C., American Society of Microbiology.

Robertson, J. B., J. C. Spain, J. D. Haddock and D. T. Gibson (1992). Oxidation of nitrotoluenes by toluene dioxygenase: evidence for a monooxygenase reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2643-2648.

Rogers, J. E. and D. T. Gibson (1977). Purification and properties of *cis*-toluene dihydrodiol dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **130**: 1117-1124.

Rojo, F., D. H. Pieper, K.-H. Engesser, H.-J. Knackmuss and K. N. Timmis (1987). Assemblage of *ortho*-cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics. *Science* **238**: 1395-1398.

Sala-Trepat, J. M. and W. C. Evans (1971). The *meta*-cleavage of catechol by *Azotobacter* species 4-oxalocrotonate pathway. *Eur. J. Biochem.* **20**: 400-413.

Sander, P., R.-M. Wittich, P. Fortnagel, H. Wilkes and W. Francke (1991). Degradation of 1,2,4-trichloro- and 1,2,4,5-tetrachlorobenzene by *Pseudomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1430-1440.

Schell, M. A. (1985). Transcriptional control of the *nah* and *sal* hydrocarbon-degradation operons by the *nahR* gene product. *Gene* **36**: 301-309.

Schläfli, H. R., M. A. Weiss, T. Leisinger and A. M. Cook (1994). Therephthalate 1,2-dioxygenase system from *Comamonas testosteroni* T-2: Purification and some properties of the oxygenase component. *J. Bacteriol.* **176**: 6644-6652.

Schlömann, M. (1982). Charakterisierung der 4-Carboxymethylen-2-en-4-olid Hydrolase Aktivität in 4-Fluorbenzoat verwertenden Stämmen von *Alcaligenes eutrophus*. Diplomarbeit Universität Göttingen.

Schlömann, M. (1988). Die verschiedenen Typen der Dienlacton Hydrolase und ihre Rolle beim bakteriellen Abbau von 4-Fluorbenzoat. Doktorarbeit, Universität Stuttgart.

Schmidt, E. and H.-J. Knackmuss (1980). Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Conversion of chlorinated muconic acids into maleylacetic acid. *Biochem. J.* **192**: 339-347.

Schraa, G., M. L. Boone, M. S. M. Jetten, A. R. W. van Neerven, P. J. Colberg and A. J. B. Zehnder (1986). Degradation of 1,4-dichlorobenzene by *Alcaligenes* sp. strain A175. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 1374-1381.

Shaw, J. P. and S. Harayama (1990). Purification and characterisation of TOL plasmid-encoded benzyl alcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *Eur. J. Biochem.* **191**: 705-714.

- Shaw, J. P. and S. Harayama** (1995). Characterization *in vitro* of the hydrolase component of xylene monooxygenase, the first enzyme of the TOL-plasmid-encoded pathway for the mineralization of toluene and xylenes. *J. Ferment. Bioeng.* **79**: 195-199.
- Shields, M. S., S. O. Montgomery, P. J. Chapman, S. M. Cuskey and P. H. Pritchard** (1989). Novel pathway of toluene catabolism in the trichloroethylene-degrading bacterium G4. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1624-1629.
- Shingler, V., F. C. H. Franklin, M. Tsuda, D. Holroyd and M. Bagdasarian** (1989). Molecular analysis of a plasmid-encoded phenol hydroxylase from *Pseudomonas* CF600. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 1083-1092.
- Shingler, V., J. Powlowski and U. Marklund** (1992). Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* **174**: 711-724.
- Simon, R., U. Priefer and A. Pühler** (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology* **1**: 784-791.
- Spain, J. C. and S. F. Nishino** (1987). Degradation of 1,4-dichlorobenzene by *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1010-1019.
- Spiess, E. and H. Görisch** (1996). Purification and characterization of chlorobenzene *cis*-dihydrodiol dehydrogenase from *Xanthobacter flavus* 14p1. *Arch. Microbiol.* **165**: 201-205.
- Stanier, R. Y. and L. N. Ornston** (1973). The β -ketoadipate pathway. *Adv. Microb. Physiol.* **9**: 89-151.
- Taeger, K., H.-J. Knackmuss and E. Schmidt** (1988). Biodegradability of mixtures of chloro- and methylsubstituted aromatics: Simultaneous degradation of 3-chlorobenzoate and 3-methylbenzoate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 603-608.
- Tan, H.-M., H. L. Loh, J. Chuang, D. H. Pieper and K. N. Timmis** (1997). Expanding the catabolic range of *Pseudomonas* sp. PS12 by the recruitment of the *bed* gene cluster from *P. putida* ML2. *Pseudomonas* 97, VI International Congress on *Pseudomonas*: Molecular Biology and Biotechnology Madrid 4.-8. Sept. 1997: Poster 214.

van der Meer, J. R., W. Roelofsen, G. Schraa and A. J. B. Zehnder (1987). Degradation of low concentrations of dichlorobenzenes and 1,2,4-trichlorobenzene by *Pseudomonas* sp. strain P51 in non sterile columns. FEMS Microbiol. Ecol. **45**: 333-341.

van der Meer, J. R., A. R. W. van Neerven, E. J. de Vries, W. M. de Vos and A. J. B. Zehnder (1991a). Cloning and characterization of plasmid-encoded genes for the degradation of 1,2-dichloro-1,4-dichloro, and 1,2,4-trichlorobenzene of *Pseudomonas* sp. strain P51. J. Bacteriol. **173**: 6-15.

van der Meer, J. R., R. I. L. Eggen, A. J. B. Zehnder and W. M. de Vos (1991b). Sequence analysis of the *Pseudomonas* sp. strain P51 *tcb* gene cluster, which encodes metabolism of chlorinated catechols: evidence for specialization of catechol 1,2-dioxygenases for chlorinated substrates. J. Bacteriol. **173**: 2425-2434.

van der Meer, J. R., W. M. de Vos, S. Harayama and A. J. B. Zehnder (1992). Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. Microbiol. Rev. **56**: 677-694.

van der Meer, J. R. (1997). Evolution of novel metabolic pathways for the degradation of chloroaromatic compounds. Antonie van Leeuwenhoek **71**: 159-178.

Vandenbergh, P. A., R. H. Olsen and J. F. Colaruotolo (1981). Isolation and genetic characterization of bacteria that degrade chloroaromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. **42**: 737-739.

Verheul, J. H. A. M., R. van den Berg and D. H. Eikelboom (1988). In situ bioremediation of a subsoil contaminated with gasoline. Contaminated soil. K. Wolf, W. J. den Brink and F. J. Colon. Norwell, MA. Kluwer Academic: 705-716.

Vollmer, M. D., P. Fischer, H.-J. Knackmuss and M. Schlömann (1994). Inability of muconate cycloisomerases to cause dehalogenation during conversion of 2-chloro-*cis,cis*-muconate. J. Bacteriol. **176**: 4366-4375.

Vollmer, M. D. and M. Schlömann (1995). Conversion of 2-chloro-*cis,cis*-muconate and its metabolites 2-chloro- and 5-chloromuconolactone by chloromuconate cycloisomerases of pJP4 and pAC27. J. Bacteriol. **177**: 2938-2941.

Wallis, M. G. and S. K. Chapman (1990). Isolation and partial characterization of an extradiol non-haem iron dioxygenase which preferentially cleaves 3-methylcatechol. Biochem. J. **266**: 605-609.

- Wang, Y., M. Rawlings, D. T. Gibson, D. Labbe, H. Bergeron, R. Brousseau and P. C. K. Lau** (1995). Identification of a membrane protein and a truncated LysR-type regulator associated with the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* F1. *Mol Gen Genet* **246**: 570-579.
- Weisshaar, M.-P., F. C. H. Franklin and W. Reineke** (1987). Molecular cloning and expression of the 3-chlorobenzoate-degrading genes from *Pseudomonas* sp. strain B13. *J. Bacteriol.* **169**: 394-402.
- Whited, G. M. and D. T. Gibson** (1991a). Toluene 4-monooxygenase, a three component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to *p*-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J. Bacteriol.* **173**: 3010-3016.
- Whited, G. M. and D. T. Gibson** (1991b). Separation and partial characterization of the enzymes of the toluene 4-monooxygenase catabolic pathway in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J. Bacteriol.* **173**: 3017-3020.
- Wieser, M., J. Eberspächer, B. Vogler and F. Lingens** (1994). Metabolism of 4-chlorophenol by *Azotobacter* sp. GP1: Structure of the *meta*-cleavage product of 4-chlorocatechol. *FEMS Microbiol. Lett.* **116**: 73-78.
- Williams, P. A., L. M. Shaw, C. W. Pitt and M. Vrecl** (1997). *xyIUW*, two genes at the start of the upper pathway operon of the TOL plasmid pWW0, appear to play no essential part in determining its catabolic phenotype. *Microbiology* **143**: 101-107.
- Winstanley, C., S. C. Taylor and P. A. Williams** (1987). pWW174: A large plasmid from *Acinetobacter calcoaceticus* encoding benzene catabolism by the β -ketoadipate pathway. *Mol. Microbiol.* **1**: 219-227.
- Worsey, M. J. and P. A. Williams** (1975). Metabolism of toluene and xylene by *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2: Evidence for a new function of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **124**: 7-13.
- Yamaguchi, M. and H. Fujisawa** (1980). Purification and characterization of an oxygenase component in benzoate 1,2-dioxygenase system from *Pseudomonas arvilla* C-1. *J. Biol. Chem.* **255**: 5058-5063.
- Yeh, W. K., D. T. Gibson and T.-N. Liu** (1977). Toluene dioxygenase: a multicomponent enzyme system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**: 401-411.

Yen, K.-M. and I. C. Gunsalus (1985). Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH7. J. Bacteriol. **162**: 1008-1013.

Yen, K.-M., M. R. Karl, L. M. Blatt, M. J. Simon, R. B. Winter, P. R. Fausset, H. S. Lu, A. A. Harcourt and K. K. Chen (1991). Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene 4-monooxygenase. J. Bacteriol. **173**: 5315-5327.

Zylstra, G. J., W. R. McCombie, D. T. Gibson and B. A. Finette (1988). Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: Genetic organization of the *tod* operon. Appl. Environ. Microbiol. **54**: 1498-1503.